

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Marin Blagović

Usporedba HPLC metoda za analizu onečišćenja azitromicinskih proizvoda

Specijalistički rad

Zagreb, 2019

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Marin Blagović

Usporedba HPLC metoda za analizu onečišćenja azitromicinskih proizvoda

Specijalistički rad

Zagreb, 2019

PSS studij: Razvoj lijekova

Mentor rada: prof.dr.sc. Biljana Nigović

Specijalistički rad obranjen je dana 15.04.2019 na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu, pred povjerenstvom u sastavu:

1. prof.dr.sc. Biljana Nigović
2. prof.dr.sc. Ana Mornar Turk
3. dr.sc. Maja Lusina Kregar

Rad ima 72 lista.

Predgovor

U ovome specijalističkom radu uspoređene su metode za analizu onečišćenja gotovih proizvoda azitromicina koje se koriste u svakodnevnom radu laboratorija kontrole kvalitete u Plivi. Zahvaljujem se rukovodstvu kontrole kvalitete koje mi je omogućilo da za izradu rada koristim analitičke metode i pripadajuće kromatograme. Također se zahvaljujem mentorici na strpljenju i savjetima tijekom oblikovanja ovoga rada. Zahvaljujem se i roditeljima na strpljenju i podršci tijekom cijeloga studija.

Sažetak

CILJ RADA

Azitromicin je makrolidni antibiotik koji se koristi za liječenje bakterijskih infekcija. Danas se nalazi na tržištu u obliku tableta, sirupa, kapsula i injekcija. Jedno od analitičkih ispitivanja koja se provode u kontroli kvalitete gotovih proizvoda azitromicina je analiza onečišćenja (srodnih spojeva i razgradnih produkata). Cilj ovog rada je opisati i objasniti kromatografske metode za analizu onečišćenja u proizvodima azitromicina koje se koriste u kontroli njihove kvalitete. Prikazane su sličnosti i razlike navedenih metoda te su uspoređene s farmakopejskim metodama za analizu onečišćenja azitromicina.

MATERIJALI I METODE

Onečišćenja mogu nastati tijekom proizvodnje ili skladištenja farmaceutskog proizvoda i njihov sadržaj se mora kontrolirati. Onečišćenja azitromicina se analiziraju tehnikom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) u svim vrstama dozirnih oblika. U analitici azitromicinskih proizvoda UV detektori se koriste za detekciju onečišćenja u tabletama, kapsulama i injekcijama azitromicina, dok se elektrokemijski detektor (EC) koristi za detekciju onečišćenja u sirupima azitromicina. Opisani su eksperimentalni uvjeti HPLC metoda: vrste stacionarnih faza, vrste i brzine protoka mobilnih faza, gradijente elucije, načini detekcije, pripreme otopina standarda i ispitivanje prikladnosti sustava. U tablicama su prikazani kromatografski parametri za identifikaciju pikova onečišćenja u azitromicinskim proizvodima.

RASPRAVA

Metode za analizu onečišćenja u tabletama, kapsulama i injekcijama azitromicina koriste istu kolonu, iste instrumentalne uvjete, iste kalibracijske i identifikacijske otopine. Postoji razlika u zahtjevima za provjeru prikladnosti sustava i na nju treba obratiti pažnju ukoliko se paralelno na istom instrumentu analiziraju uzorci tableta, kapsula ili injekcija. Ukoliko se provjere svi uvjeti za ispitivanje prikladnosti sustava nema prepreke za analizu ovih vrsta uzoraka paralelno na istom sustavu. Slično se može zaključiti za uzorke sirupa azitromicina. Sve doze i formulacije sirupa se mogu analizirati paralelno na istom sustavu s elektrokemijskim detektorom ukoliko se obrati pažnja na ispunjavanje svih uvjeta prikladnosti sustava.

ZAKLJUČAK

U redovnoj analitici farmaceutskih proizvoda u laboratorijima kontrole kvalitete od velike je važnosti da se analize različitih doza ili formulacija s istom djelatnom tvari mogu raditi zajedno na istom kromatografskom sustavu. Ukoliko usporedimo metodu za analizu onečišćenja u azitromicin injekcijama koja se koristi u Plivi s onom u farmakopeji, vidljivo je da je farmakopejska metoda složenija i da bi samo za analizu onečišćenja injekcija vjerojatno trebalo više radnih dana i više analitičara. Tako bi se smanjila produktivnost laboratorija i broj analiza koje se izvrše u jedinici vremena, što u konačnici može dovesti do skupljeg lijeka za pacijenta.

Summary

AIM OF WORK

Azithromycin is a macrolide antibiotic used to treat bacterial infections. Today, it is marketed in the form of tablets, syrups, capsules and injections. One of the analytical tests carried out in the quality control of finished products of azithromycin is the analysis of impurities (related compounds and degradation products). The aim of this paper is to describe and explain chromatographic methods for analysis of impurities in azithromycin products which are used in their quality control. The similarities and differences of the methods are shown and compared with the pharmacopoeial methods for the analysis of azithromycin degradation products.

MATERIALS AND METHODS

Amount of degradation products may arise during the manufacture or storage of a pharmaceutical product and their content must be controlled. Azithromycin degradation products are analyzed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) in all types of dosage forms. In the analysis of azithromycin finished products UV detectors are used for detecting impurities in tablets, capsules and azithromycin injections, while the electrochemical detector (EC) is used to detect impurities in azithromycin syrups. The experimental conditions of the HPLC methods are described: stationary phase types, types and rates of mobile phase flow, gradient elution, detection methods, standard solution preparation and system suitability test. The tables show the chromatographic parameters used for the identification of degradation product peaks in azithromycin products.

DISCUSSION

Methods for analysis of degradation products in tablets, capsules and azithromycin injections use the same column, the same instrumental conditions, the same calibration and identification solutions. There is a difference in system suitability check requirements and attention should be paid if the samples of tablets, capsules or injections are analyzed together. If all the conditions for the system suitability test are checked, there are no obstacles to the analysis of these types of samples in parallel in the same system. Similar can be concluded for samples of azithromycin syrups. All dosages and formulations of the syrups can be analyzed together on the same system with an electrochemical detector if attention is paid to the fulfillment of all system suitability conditions.

CONCLUSION

In a regular analytics of pharmaceutical products in quality control labs it is of great importance that analyzes of different doses or formulations with the same active substance can be performed together on the same chromatographic system. If we compare the method for the analysis of azithromycin injections used in *Pliva* with those in Pharmacopoeia, it is apparent that the pharmacopoeia method is more complex and that it would probably take more days and more analysts to analyze degradation products in samples of azithromycin injections. This would reduce the laboratory's productivity and the number of analyzes performed in the unit of time, which ultimately can lead to a more expensive drug for the patient.

Sadržaj

1.UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA.....	1
1.1.Kontrola kvalitete u farmaceutskoj industriji.....	1
1.2.Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC).....	2
1.2.1.Elektrokemijski detektor (EC).....	4
1.2.2.UV detektori (VWD i DAD).....	7
1.3.Azitromicin.....	11
1.4.Onečišćenja u ljekovitim supstancijama i farmaceutskim proizvodima.....	12
1.5.Validacija analitičke metode za određivanje onečišćenja azitromicina.....	15
1.6.Stabilitetna ispitivanja.....	24
2.CILJ ISTRAŽIVANJA.....	26
3.MATERIJALI I METODE.....	27
3.1.Metoda za analizu onečišćenja u tabletama azitromicina.....	27
3.1.1.Metoda za analizu onečišćenja u tabletama azitromicin dihidrata.....	27
3.1.2.Metoda za analizu onečišćenja u tabletama azitromicin monohidrata.....	30
3.2.Metoda za analizu onečišćenja u kapsulama azitromicina.....	34
3.3.Metoda za analizu onečišćenja u injekcijama azitromicina.....	38
3.4.Metoda za analizu onečišćenja u sirupu azitromicina.....	41
3.4.1.Metoda za analizu onečišćenja u sirupu azitromicin dihidrata.....	42
3.4.2.Metoda za analizu onečišćenja u sirupu azitromicin monohidrata.....	44
4.RASPRAVA.....	48
4.1.Analitika onečišćenja u tabletama azitromicina (monohidrat i dihidrat).....	48
4.2.Analitika onečišćenja u kapsulama azitromicina.....	56
4.3.Analitika onečišćenja u injekcijama azitromicina.....	57
4.4.Analitika onečišćenja u sirupima azitromicina (monohidrat i dihidrat).....	59

4.5.Farmakopejske metode i pregled literature.....	66
5.ZAKLJUČAK.....	68
6.LITERATURA.....	69
7.ŽIVOTOPIS.....	72

1.1 Kontrola kvalitete u farmaceutskoj industriji

Kvaliteta u farmaceutskoj industriji nužna je za opskrbu sigurnim i djelotvornim lijekovima, kao i za konkurentnost na globalnom tržištu lijekova. Otkako se svijet okupio kako bi uskladio svoje prakse i smjernice te američka Agencija za hranu i lijekove (FDA) predstavila trenutnu dobru proizvođačku praksu (cGMP) za 21. stoljeće, sve je veća svijest o značaju kvalitete farmaceutskih proizvoda. Također, značajna uloga vlada država naglašena je zajedničkom izjavom Međunarodne farmaceutske federacije (FIP) i Međunarodne federacije udruga farmaceutskih proizvođača (IFPMA) kako bi se osigurala sigurnost lijekova u cilju zaštite pacijenta, što je dovelo do toga da je farmaceutska industrija jedna od najstrožije reguliranih industrija već više od 50 godina [1].

Farmaceutska kvaliteta se može definirati i ispitati na više načina. Standardi kvalitete se objavljuju periodički u farmakopejama i u različitim vodičima i publikacijama. Oni detaljno opisuju osobine lijeka i analitičke metode za kontrolu kvalitete lijeka. Standardi se mogu razlikovati od farmakopeje do farmakopeje, tako da lijek može zadovoljavati standarde jedne farmakopeje, a druge ne. Ukoliko standardi nisu usvojeni, što je slučaj kod novih lijekova, analitičke metode razvija proizvođač i prilaže ih u registracijski dosje [2].

Termin „kontrola kvalitete“ (*Quality control, QC*) označava sve postupke koji se provode da se osigura identitet, kvaliteta i čistoća lijeka. Postupci mogu varirati od jednostavnih fizikalno-kemijskih metoda koji potvrđuju identitet određene farmaceutske supstancije (tankoslojna kromatografija, IR spektroskopija itd.) do kompleksnih metoda opisanih u farmakopejskim monografijama [3]. Kontrola kvalitete počinje s polaznim materijalima, prati proizvodnju, sve do gotovog proizvoda. Kontrola

kvalitete polaznih materijala uključuje i kontrolu primarne i sekundarne ambalaže. Također, mikrobiološka analiza je iznimno važna, naročito za sterilne proizvode [4].

1.2 Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC, *high performance liquid chromatography*)

Da bi tehnika razdvajanja bila moćna mora biti u stanju razdvojiti smjese s velikim brojem sličnih analita. Tehnika, u konačnici, mora omogućiti kvalitativne i kvantitativne informacije o analitima. Na primjer, na kromatogramu svaki spoj u smjesi ima svoje vrijeme eluiranja (točka na kojoj se signal pojavljuje na zaslonu) pod danim skupom uvjeta; a površina i visina svakog signala (kromatografskog pika) proporcionalni su količini odgovarajuće tvari. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) vrlo je učinkovita, tj. ona daje izvrsna odvajanja u kratkom vremenu. "Izumitelji" moderne kromatografije, Martin i Synge, su još od 1941. znali da, u teoriji, stacionarna faza zahtijeva vrlo male čestice i stoga je visoki tlak bitan za protok mobilne faze kroz kolonu. Kao rezultat, HPLC se ponekad naziva tekućinska kromatografija visokog tlaka [5].

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti je najčešće korištena kromatografska tehnika za određivanje lijekova u farmaceutskim proizvodima i biološkim materijalima. Mobilna faza je tekućina koja prolazi kroz kolonu pakiranu s materijalom koji zadržava analite injektirane u sustav. Analiti se injektiraju u tok mobilne faze neposredno prije separacijske kolone. Izlaz iz kolone je povezan s detektorom i tu se eluirane supstancije detektiraju [6].

Postoje četiri osnovne vrste HPLC tehnike. To su normalno fazna kromatografija (NP, *normal phase chromatography*), obrnuto fazna (RP, *reversed phase chromatography*),

ionska kromatografija (IEX, *ion exchange chromatography*) i gel filtracijska kromatografija (SEC, *size exclusion chromatography*) [7]. Najzastupljenija je obrnuto fazna kromatografija, a ona se koristi i u analitici azitromicinskih proizvoda.

Uobičajeni HPLC sistem se sastoji od pumpe, injektora, kolone, detektora i računala za obradu podataka. HPLC sustavi mogu biti modularni i integrirani. U integriranom, sve komponente su unutar jednog kućišta. U modularnom, sve komponente su u odvojenim modulima. Potonji sustavi su jednostavniji za servisiranje jer se svaki modul može odvojeno servisirati ili zamijeniti. Primjer modularnog sustava su Agilent® 1100® i 1200® koji se najčešće koriste u laboratorijima Plive za analizu azitromicinskih proizvoda.

Sustav za kontrolu otapala se sastoji od pumpe, spremnika s otapalima i degazera koji otplinjava mobilnu fazu. Mora omogućiti konstantan protok otapala (mobilne faze) i mora ispravno miješati otapala ukoliko se radi gradijentna analiza. Sve komponente sustava moraju biti inertne i ne smiju reagirati sa sastavnicama mobilne faze. Uobičajeno se koriste binarne pumpe (dvije pumpe, najviše dva otapala) i kvarterne pumpe (najviše četiri otapala).

Glavni zadatak injektorskog modula je precizno injektiranje uzorka u protok mobilne faze. Automatski injektor (*autosampler*) samostalno injektira uzorak iz viala što pojednostavljuje i ubrzava rad. Nosač viala je termostatiran i omogućuje preciznu kontrolu temperature uzoraka.

Termostat kolone drži kolonu na točno definiranoj temperaturi što smanjuje oscilacije retencijskih vremena analita [8].

Za detekciju odvojenih analita služe detektori. Zbog raznovrsne primjene tekućinske kromatografije razvijeni su mnogobrojni detektori, na primjer, detektor mjerenja

apsorbancije u UV području (UV ili DAD, *diode array detector*), elektrokemijski detektor (*EC detector*), detektor indeksa refrakcije (*refractive indeks detector*), fluorescencijski detektor (*fluorescence detector*) itd. U analitici azitromicinskih proizvoda koriste se UV i EC detektori. Ukratko će se objasniti na koji način se koriste i kako detektiraju analite.

1.2.1. Elektrokemijski detektor (EC)

Elektrokemijski detektor se redovno koristi u analitici azitromicinskih proizvoda. Onečišćenja azitromicin sirupa se detektiraju uz pomoć elektrokemijskog detektora. U redovnom radu laboratorija kontrole kvalitete koristi se BAS[®] LC-4C[®] elektrokemijski detektor [9,10].

Elektrokemijsku detekciju možemo promatrati kao elektrolizu analita na fiksnoj točki tijekom toka tekućine. Tekućina koja teče u ovom slučaju je eluens iz kromatografske kolone s otopljenim supstancijama (analitima) razdvojenima različitim razinama rezolucije. Zone s analitima prolaze kroz ćeliju vrlo malenog volumena, gdje se protok usmjerava na tanak film koji prolazi preko elektrode koja se drži na fiksnom potencijalu. Ako je potencijal veći (pozitivniji za oksidaciju, negativniji za redukciju) od onoga potrebnoga za elektrolizu analita, mjerljiva količina naboja prolazi iz elektrode do analita (ili obrnuto). Rezultirajuća struja izravno je proporcionalna koncentraciji otopljenih tvari koje prolaze kroz ćeliju.

Elektrokemijska detekcija u tekućinskoj kromatografiji je amperometrijsko određivanje. Za razliku od mjerenja, kao što je na primjer pH, razlike potencijala u uvjetima nulte struje (*zero current conditions*), elektrokemijska (amperometrijska) detekcija mjeri jakost struje pri određenom potencijalu. Amperometrijska detekcija je vrlo osjetljiva tehnika. Izmjerena struja je obično u području pikoampera ili nanoampera. Također,

budući da je detekcija uzrokovana kemijskom (redoks) reakcijom, odgovor detektora (i *drift* bazne linije) ovise o temperaturi što je posebno primjetno ukoliko se radi pri većim naponima [11].

Na elektrodu se može gledati kao na kemijski reagens. Što je pozitivniji njegov potencijal, jače je oksidacijsko sredstvo; kad potencijal postaje negativniji, postaje jači redukcijski agens.

U oba slučaja, kako koncentracija otopljene tvari raste i pada tijekom prolaska kroz detektorsku ćeliju, elektroliza proporcionalno slijedi te promjene. Struja koja potječe od elektrolize, kao funkcija vremena, se pojačava i šalje u sustav za obradu podataka da bi se dobio kromatogram.

BAS[®] LC-4C[®] detektor postavlja referentnu elektrodu na „nulti“ potencijal, a potencijal radne elektrode prema referentnoj. Razlika potencijala između elektrode i otopine je značajna u elektrokemiji, a ne potencijal same elektrode. Svrha elektronike detektora je da kontrolira ovu razliku potencijala, istodobno pretvarajući struju (nastalu izmjenom elektrona između elektrode i analita) u napon koji se lako može snimiti i obraditi računalom. U analitičkoj metodi u kojoj je naveden potencijal elektrokemijskog detektora mora se navesti koja referentna elektroda se koristi u elektrokemijskoj ćeliji. Na primjer, uobičajeno je reći kofeinska kiselina oksidira na potencijalu od +500 mV prema Ag / AgCl referentnoj elektrodi.

Staklasti ugljik (*Glassy carbon*, GC) često se koristi kao materijal za izradu radne elektrode i smatra se univerzalnim materijalom elektrode. Staklasti ugljik je tvrdi, amorfni ugljični materijal koji se može polirati. Kada se nalazi u bloku detektorske ćelije, nudi dobru otpornost na otapala, a osobito je koristan kod mobilnih faza koje sadrže acetonitril ili velike postotke metanola. Koristi se i u potpuno nevodenim sustavima s dobrim uspjehom.

Budući da amperometrijska detekcija ovisi o prijenosu elektrona između analita i površine elektrode, važno je odabrati otapalo (mobilnu fazu) koja učinkovito dopušta da se dogodi redoks reakcija. Primarna ograničenja mobilne faze su:

- elektroliti moraju biti prisutni, obično pri koncentracijama od 0,01M do 0,1M, kako bi se naboji prenijeli kroz elektrokemijsku ćeliju
- otapalo mora imati dovoljno visoku dielektričnu konstantu da slobodno dopušta ionizaciju elektrolita
- mobilna faza (elektrolit + otapalo) mora biti elektrokemijski inertna na površini elektrode; tj. pozadinska struja pri primijenjenom potencijalu treba biti zanemariva, bez utjecaja na integritet površine elektrode.

Čak i pod gore navedenim ograničenjima, opseg elektrokemijske detekcije je vrlo širok, budući da kromatografija ionske izmjene i većina odvajanja u kromatografiji obrnutih faza (na primjer, odvajanja onečišćenja azitromicina u sirupu) koriste ove vrste mobilnih faza.

Elektrokemijska detekcija *Dual series* može u određenim slučajevima poboljšati selektivnost i granicu detekcije. Prva elektroda funkcionira kao derivatizacijska (generatorska), dok druga elektroda detektira produkte nastale reakcijom na prvoj elektrodi. Postoje mnoge primjene ovog načina detekcije, ali primarni je cilj poboljšati detekciju spojeva stvaranjem elektrokemijskih produkata koji se mogu detektirati na povoljnijem potencijalu (gdje su šum i smetnje manje). Ovaj princip je često uspješan jer većina reakcija u pozadini (medija/mobilne faze) su kemijski nepovratne (npr. smanjenje kisika u vodenim medijima, redukcija vodikovog iona i oksidacija vode).

Rad i postavke EC detektora se kontroliraju gumbima na prednjoj strani detektora. Na primjer, gumbom *Power* uključuje se električna energija upravljačkom sklopu uređaja. Gumbom *Display* određuje se koja funkcija će biti prikazana na zaslonu uređaja. Na

primjer, kada je za zaslonu prikazano *App E* prekidačem *Potential* se postavi oksidacija ili redukcija, a uz pomoć kotačića *Potential adjust* se postavi željeni potencijal. Prekidačem *Cell* radna elektroda se uključuje (postavljena razlika potencija se primjenjuje), odnosno isključuje.

Prilikom rada potrebno je obratiti posebnu pažnju na prekidač *Cell*. On mora biti u *STBY* položaju kada je LC-4C isključen i prilikom servisa elektroda. Rastavljanje ćelije koja radi može trajno oštetiti radnu elektrodu i elektroničke sklopove. Za detaljnije informacije o tehnici i detektoru koriste se upute proizvođača [9,10].

1.2.2. UV detektori (VWD i DAD)

Za razliku od EC detektora koji se koristi samo kod analiza onečišćenja azitromicina u sirupu, UV detektor se koristi za sve ostale analize onečišćenja azitromicinskih proizvoda. Općenito, razlikujemo dvije vrste UV detektora, VWD (*variable wavelenght detector*) i DAD (*diode array detector*). S obzirom da se najčešće koriste instrumenti proizvođača Agilent fokus će biti na Agilent® 1200® VWD i DAD detektorima. Načelo rada je slično za sve HPLC UV detektore.

VWD (*variable wavelenght detector*) detektor

Agilent® 1200® VWD detektor [12] dizajniran je za najviše optičke performanse, usklađenost s dobrom laboratorijskom praksom (*good laboratory practice*, GLP) i jednostavno održavanje. Ugrađena je deuterijska lampa za najveći intenzitet i najnižu granicu detekcije uz raspon valnih duljina od 190 nm do 600 nm i protočna ćelija (standardna 10 mm i 14 µL). Pristup lampi i protočnoj ćeliji je jednostavan i omogućava

brzu zamjenu. Ugrađen je i holmijev oksidni filter za brzu provjeru točnosti valnih duljina.

Izvor zračenja je deuterijska lampa za valne duljine u ultraljubičastom (UV) dijelu spektra od 190 do 600 nm. Svjetlosna zraka iz deuterijske lampe prolazi kroz leću, sklop s filterom (može se postaviti bez filtera ili holmijev oksidni filter), ulazni prorez, sferno ogledalo, optičku mrežicu, drugo sferno ogledalo, razdvajač snopa (*beam splitter*) i na kraju kroz protočnu ćeliju i dolazi do fotodiode. Snop zračenja prolazi kroz protočnu ćeliju gdje se apsorbira ovisno o otopinama u ćeliji, a intenzitet apsorpcije se pretvara u električni signal fotodiodom. Dio svjetla usmjeren je na referentnu fotodiodu pomoću razdvajača snopa kako bi se dobio referentni signal za kompenzaciju fluktuacije intenziteta izvora svjetlosti. Odabir valne duljine je napravljen rotacijom optičke mrežice, koja se izravno pokreće pomoću motora. Ova konfiguracija omogućuje brzu promjenu valne duljine.

Za dobru ponovljivost u kromatografskoj analizi, detektor i lampa trebaju biti uključeni najmanje jedan sat prije početka rada. U protivnom se bazna linija detektora može još uvijek pomicati (*baseline drift*), što ovisi i o okolini (blizina klimatizacijskih otvora, itd.). Metoda za analizu uzorka propisuje valnu duljinu pri kojoj se detektiraju analiti i, eventualno, za VWD detektor širinu pika (*peakwidth*). Veličina (duljina) detektorske ćelije uglavnom nije propisana i koristi se ona koja je dostupna u laboratoriju, obično 1 cm (10 mm). Ako je moguć izbor različitih detektorskih ćelija, može se upotrijebiti veća protočna ćelija da bi se dobila bolja granica detekcije. Korištenjem manje protočne ćelije dobije se bolje razlučivanje pikova (spektralna rezolucija). Stoga, protočne ćelije s dužim putanjama daju veće signale. Iako se šum obično povećava malo s povećanjem duljine puta, dobije se bolji omjer signala i šuma (*signal-to-noise ratio*).

Odabir širine pika omogućava postavljanje optimalnog vremena odziva detektora za analizu. Širina pika je definirana kao širina, u minutama, na polovici visine pika. Širina pika se definira prema najužem piku na kromatogramu. Detektor zanemaruje sve pikove koji su znatno uži, ili širi, od postavke širine pika. Kada se postavi širina pika (u minutama), odgovarajuće vrijeme odgovora se postavlja automatski i odabrana je odgovarajuća brzina prijenosa podataka za prikupljanje signala. Veza između vrijednosti širine pika i vremena odziva detektora su uglavnom navedene u uputama proizvođača ili u kromatografskoj programskoj podršci. Na primjer, za postavku širine pika (*peakwidth*) >0.10 min vrijeme odziva (*response time*) iznosi 2.0 s, a brzina akvizicije podataka (*data rate*) 3.43Hz.

Detaljnije informacije o podešavanju i radu detektora su dostupne u originalnim uputama proizvođača za Agilent® 1200® VWD [12].

DAD (*diode array detector*) detektor

Izvor osvjetljenja je deuterijska lampa za ultraljubičasti (UV) dio elektromagnetskog spektra. Njezino svjetlo je fokusirano ogledalom na ulazu u detektorsku ćeliju. Svjetlo prolazi i napušta detektorsku ćeliju na drugoj strani i usmjerava se pomoću preklonog zrcala kroz sklop proreza na optičku mrežicu koja ga raspršuje na fotodiode. Ovaj detektor omogućuje praćenje apsorpcije elektromagnetskog zračenja na svim valnim duljinama istovremeno [13].

Samom činjenicom da DAD snima spektar u zadanom području valnih duljina omogućava korisniku veću fleksibilnost od VWD detektora. Kao i u slučaju VWD i kod DAD detektora je moguće podesiti širinu pika (*peakwidth*) koja se definira prema najužem piku na kromatogramu. Podešavanjem širine pika postavlja se optimalno

vrijeme odziva detektora i odgovarajuća brzina prijenosa podataka za prikupljanje signala i spektara. Vrijeme odziva opisuje koliko brzo signal detektora prati promjene apsorbancije u protočnoj ćeliji. Ispravnom postavkom može se značajno smanjiti razina šuma i podesiti optimalna brzina prikupljanja podataka. Preporuka je da najuži pik bude opisan sa 15 do 25 točaka.

Promjena duljine ćelije je također moguća. Prema tome, protočne ćelije s duljim putanjama daju veće signale. Iako se šum obično povećava malo s povećanjem duljine puta, dobije se bolji omjer signala i šuma (*signal-to-noise ratio*).

Signal detektora obuhvaća niz podatkovnih točaka (*data points*) tijekom vremena, s prosjekom apsorbancija u području (*bandwidth*) valne duljine uzorka (*sample wavelenght*) umanjenu za prosječnu apsorbanciju referentnog valnog područja (*reference wavelenght*). Na primjer, ukoliko se signal u metodi postavi na - uzorak 210/6, referenca 450/80, znači da će konačni kromatogram biti prosječna apsorpcija od 207-213 nm umanjena za prosječnu apsorpciju od 410-490 nm. Šire područje uglavnom rezultira smanjenjem šuma. Preporučuje se uporaba referentne valne duljine za smanjenje pomaka bazne linije uzrokovanoj fluktuacijama sobne temperature ili promjenom indeksa loma tijekom gradijente analize.

Dodatno se može podesiti i širina proreza (*slit width*). Uski prorez osigurava bolju spektralnu rezoluciju za analite s vrlo finim strukturama u apsorpcijskom spektru. Široki prorez koristi više svjetla koje prolazi kroz protočnu ćeliju. To daje niži šum bazne linije. Preporuka je koristiti signale koji imaju područje valnih duljina barem toliko široko kolika je širina proreza. UV kromatogram ili signal je grafički prikaz podataka o apsorpciji u odnosu na vrijeme i definiran je valnom duljinom i širinom vrpce (područja). Valna duljina označava središte područja za detekciju. Područje određuje raspon valnih duljina preko kojih se za vrijednosti apsorbancija uzima prosjek kako bi se dobio

rezultat u svakoj vremenskoj točki. Prosječna apsorbancija iz referentne valne duljine bit će oduzeta od vrijednosti na signalu valne duljine za prikaz izlaznog kromatograma. Detaljnije informacije o podešavanju i radu detektora su dostupne u originalnim uputama proizvođača za Agilent® 1200® DAD [13].

1.3 Azitromicin

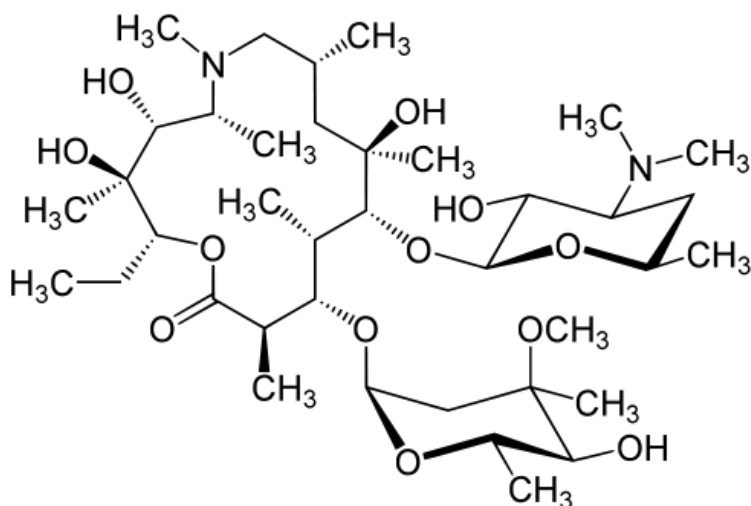
Azitromicin je makrolidni antibiotik koji inhibira sintezu proteina u bakterijama, međustaničnu komunikaciju bakterija (*quorum-sensing*) i smanjuje formiranje biofilma. Uspješno se nakuplja u stanicama, posebno fagocitima, te se na mjesto infekcije dostavlja u velikim količinama. Indiciran je za liječenje respiratornih, urogenitalnih, dermalnih i ostalih bakterijskih infekcija, a također pokazuje i imunomodulacijski učinak u kroničnim upalnim poremećajima, kao što su post-transplantacijski bronhiolitis i rozacea [14]. Preporučena doza i trajanje terapije kod određenih infekcija u odraslih osoba prikazana je u Tablici 1 [15].

Infekcija	Preporučena doza i trajanje terapije
Pneumonia (blaži oblik)	500mg u jednoj dozi prvi dan, nakon toga 250mg od drugog do petog dana.
Faringitis/tonzilitis (druga linija terapije)	
Kožne infekcije	
Akutne bakterijske egzacerbacije kroničnog bronhitisa (blagi do srednjeg oblika)	500mg u jednoj dozi prvi dan, nakon toga 250mg od drugog do petog dana, ili 500mg kroz 3 dana.
Akutni bakterijski sinusitis	500mg jednom dnevno, 3 dana.

Genitalni ulkus, ne-gonokokni uretritis i cervicitis	Jedna doza od 1g.
Gonokokni uretritis i cervicitis	Jedna doza od 2g.

Tablica 1. Primjer doziranja Zithromax (azitromicin) tableta odraslim pacijentima.

Otkriven je u hrvatskoj prijestolnici, Zagrebu 1980. godine od strane tima istraživača u hrvatskoj farmaceutskoj tvrtki Pliva: Gabrijela Kobrehel, Gorjana Radobolja-Lazarevski i Zrinka Tamburašev, kojeg je predvodio dr. Slobodan Đokić [16].



Slika 1. Kemijska struktura azitromicina.

1.4 Onečišćenja u ljekovitim supstancijama i farmaceutskim proizvodima

Onečišćenja u ljekovitim supstancijama mogu nastati tijekom procesa proizvodnje (procesna onečišćenja) ili tijekom skladištenja supstancije (razgradna onečišćenja). Razgradni produkti u farmaceutskim oblicima mogu potjecati od same ljekovite supstancije ili od reakcije ljekovite supstancije s pomoćnim tvarima ili kontaktnom ambalažom.

ICH vodiči koji opisuju onečišćenja u farmaceutskim proizvodima i aktivnim supstancijama i propisuju granice za pojedina onečišćenja su:

- Q3A (R2) za onečišćenja u novim ljekovitim supstancijama [17]
- Q3C (R6) za ostatna otapala [18]
- Q3D za elementalna onečišćenja [19]
- Q3B (R2) za onečišćenja u gotovim proizvodima [20]

Onečišćenja u ljekovitim supstancijama (*drug substance*) se dijele u sljedeće kategorije:

1. organska onečišćenja
2. anorganska onečišćenja
3. ostatna otapala

Organska onečišćenja mogu nastati u procesu proizvodnje ili tijekom skladištenja ljekovite supstancije. Mogu biti poznata i nepoznata, isparljiva ili neisparljiva, a uključuju sljedeće:

1. polazne sirovine
2. nusprodukte
3. intermedijere
4. razgradne produkte
5. reagense, ligande, katalizatore
6. geometrijske i stereoizomere

Anorganska onečišćenja potječu iz procesa proizvodnje. Uglavnom su poznata i identificirana i uključuju sljedeće:

1. reagense, ligande, katalizatore
2. teški metale i ostale ostatne metale
3. anorganske soli
4. ostale materijale (npr. ostatci od filtriranja)

Za svaku ljekovitu supstanciju su postavljene granice za organska i anorganska onečišćenja, a ona ovise o vrsti onečišćenja i maksimalnoj dnevnoj dozi. Tijekom razvoja ljekovite supstancije onečišćenja se moraju pratiti da se osigura sigurnost i kvaliteta lijeka.

Specifikacija gotovog proizvoda mora uključivati popis razgradnih onečišćenja koji se očekuju tijekom proizvodnje ili skladištenja. Za onečišćenja koja su potentna ili toksična limiti detekcije i kvantifikacije u metodi analize moraju biti razmjerni sadržaju onečišćenja koje se kontrolira.

Onečišćenja koja nisu razgradni produkti (procesna onečišćenja) se obično ne prate u farmaceutskom proizvodu jer su već analizirana u polaznom materijalu i ne očekuje se njihov porast.

Specificirana onečišćenja mogu biti identificirana ili neidentificirana. Specificirana onečišćenja su onečišćenja koja su pojedinačno navedena u specifikaciji ljekovite supstancije ili farmaceutskog proizvoda i uz koje je navedena najveća dopuštena vrijednost. Neidentificirana onečišćenja su onečišćenja kojima nije poznata struktura, definiraju se obično nekim kvalitativnim parametrom, na primjer vremenom zadržavanja u navedenoj kromatografskoj metodi. Identificiranim onečišćenjima je poznata kemijska struktura. Nespecificirana onečišćenja su limitirana općim kriterijem prihvatljivosti i nisu pojedinačno navedena u specifikaciji. Maksimalna dozvoljena količina razgradnog onečišćenja u farmaceutskom proizvodu navedena je u Tablici 2.

Granica izvještavanja	
Maksimalna dnevna doza	Granica
≤1 g	0,1%
>1 g	0,05%
Granica identifikacije	
Maksimalna dnevna doza	Granica
<1 mg	1,0% ili 5 µg TDI, što je niže
1 mg – 10 mg	0,5% ili 20 µg TDI, što je niže
>10 mg – 2 g	0,2% ili 2 mg TDI, što je niže
>2 g	0,10%
Granica kvalifikacije	
Maksimalna dnevna doza	Granica
<10 mg	1,0% ili 50 µg TDI, što je niže
10 mg – 100 mg	0,5% ili 200 µg TDI, što je niže
>100 mg – 2 g	0,2% ili 3 mg TDI, što je niže
>2 g	0,15%

Tablica 2. Prikaz specifikacijskih granica za razgradna onečišćenja. TDI (*total daily intake*), ukupni dnevni unos. Granice su postavljene kao postotak djelatne tvari ili ukupni dnevni unos onečišćenja.

1.5 Validacija analitičke metode za određivanje onečišćenja azitromicina

Analitička metoda kojom se određuje sadržaj onečišćenja mora biti validirana. U analitici farmaceutskih proizvoda preporuke o validaciji analitičke metode temelje se

na smjernicama Međunarodne konferencije o usklađivanju tehničkih zahtjeva za registraciju lijekova za ljudsku uporabu (*ICH-International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*).

Dokument *Validacija analitičkih postupaka: Tekst i metodologija* je temeljni dokument za validaciju analitičke metode [21]. Prema dokumentu, proces validacije, koji bi trebao pokazati da je analitički postupak prikladan za svoju namjenu, sastoji se od niza postupaka kojima se utvrđuje točnost, preciznost, specifičnost, granica detekcije i kvantifikacije, linearnost, radno područje i robusnost metode. Analitički postupak, ili, analitička metoda propisuje način provođenja analize. Treba opisati detaljno sve korake potrebne za obavljanje svakog analitičkog ispitivanja. To može uključivati uzorak, referentni standard i reagentse, uporabu instrumenata, izradu kalibracijske krivulje i korištenje formula za izračun. Prikladnost sustava (*SST-system suitability test*) je sastavni dio mnogih analitičkih postupaka. Ispitivanje prikladnosti sustava se temelji na konceptu da su oprema, elektronika, analitičke operacije i referentni standardi cjelina koja se kao takva može vrednovati, odnosno potvrđuje da su radni uvjeti u kojima se provodi analiza valjani. Parametri ispitivanja prikladnosti sustava se utvrđuju za određeni postupak i ovise o vrsti analitičkog postupka. U Europskoj farmakopeji (Ph. Eur.) ispitivanja prikladnosti sustava navedena su u farmakopejskim monografijama [6].

Sve metode za analizu onečišćenja azitromicinskih proizvoda su validirane. Validacija se provodi prema internim propisima koji su u skladu sa ICH i drugim smjernicama. Navest će se, ukratko, primjer validacije metode za analizu onečišćenja u tabletama azitromicina.

Selektivnost metode podrazumijeva da su svi pikovi onečišćenja odvojeni od glavnog pika i od pikova placeba. Posebno je pripremljena otopina sa svim sastavnicama placeba. Studija selektivnosti je provedena i dokazano je da metoda uspješno odvaja placebo i onečišćenja. Otopine uzorka i placeba su korištene i za stres ispitivanja. Otopine su u stres ispitivanjima tretirane s HCl, NaOH, H₂O₂, povišenom temperaturom i svjetlom. Razgradni produkti su razdvojeni od pikova onečišćenja.

Studija linearnosti je provedena u području od 0,10% do 3,00% od nominalne koncentracije azitromicina i 0,05% do 0,4% koncentracije onečišćenja Gx. Priređene su otopine na 5 koncentracijskih nivoa (0,1%, 0,5%, 1%, 2% i 3% za azitromicin i 0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,3% i 0,4% za onečišćenje Gx). Nakon provedene kromatografske analize i statističke obrade podataka potvrđeno je da je metoda linearna u zadanom području. Točnost metode nije provjerena zato što su već provedeni selektivnost i linearnost kojima je dokazano da je metoda dobro implementirana.

Provedena su ispitivanja za provjeru preciznosti metode (ponovljivost i intemedijarna preciznost). Relativna standardna devijacija više priprema istog uzorka odgovaraju zadanim kriterijima. Također, ponovljivost je ispitana na više različitih kolona.

Provjerena je i stabilnost otopina standarda. Faktor odgovora detektora je uspoređen s novom pripremom standarda (kriterij prihvatljivosti RSD ≤ 5%). Raspon je preuzet iz studije linearnosti.

Limit detekcije je koncentracijski nivo u kojem je omjer signala i šuma 3:1, a limit kvantifikacije onaj u kojem je omjer signala i šuma 10:1.

Robusnost metode je provjerena mijenjanjem pH mobilne faze „A“ ±0,2 pH jedinice u odnosu na propisanih 8,9. Zadovoljeni su uvjeti prikladnosti sustava i smatra se da je metoda robusna.

Napravljena je i studija u kojoj je uspoređen analitički prinos (*recovery*) kada se uzorak filtrira sa šest različitih filtera u odnosu na centrifugiranje. Dokazano je da se može koristiti bilo koji od šest ispitanih filtera, na primjer *Whatman® Spartan® Regenerated cellulose 0.45µm*.

Sadržaj pojedinačnih onečišćenja se računa prema sljedećoj formuli:

$$\text{Sadržaj onečišćenja} = \frac{rU}{rS} \times \frac{CS}{CU} \times P \times F1 \times \frac{1}{F2} \times 100$$

rU-površina pika pojedinačnog onečišćenja u injektiranju uzorka

rS-površina pika azitromicina u injektiranju standarda

CS-koncentracija azitromicina u injektiranju standarda (mg/mL)

CU-teoretska koncentracija azitromicina u uzorku (mg/mL)

P-sadržaj standarda azitromicina (µg/mg)

F1-faktor konverzije, 0,001mg/µg

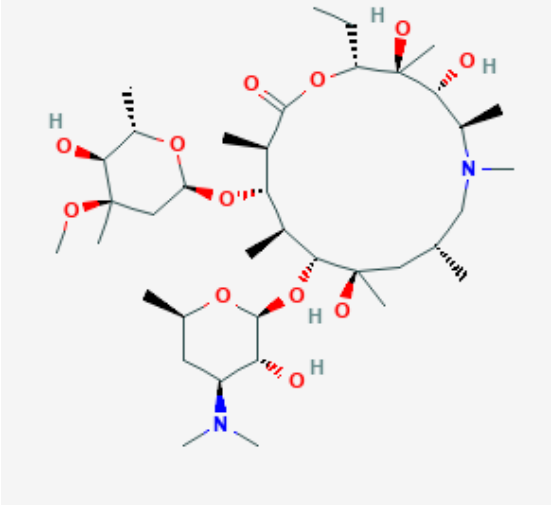
F2-relativni faktor odgovora detektora za pojedino onečišćenje (Tablica 3)

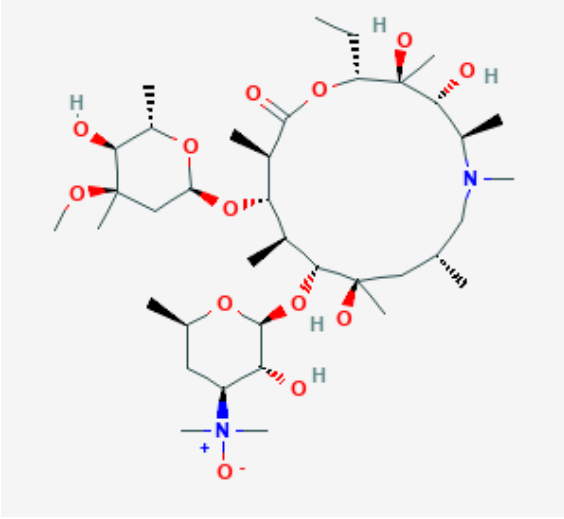
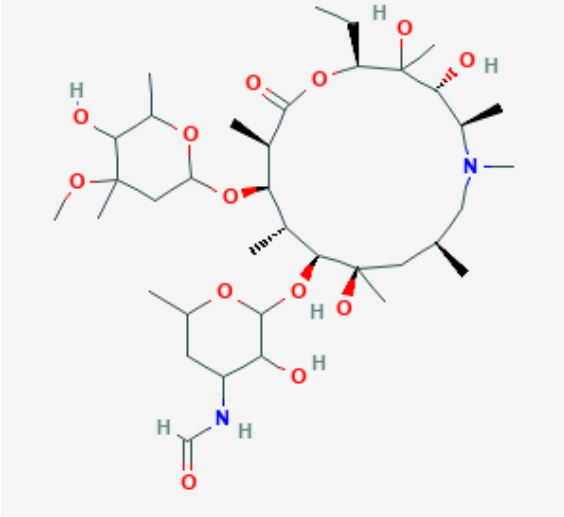
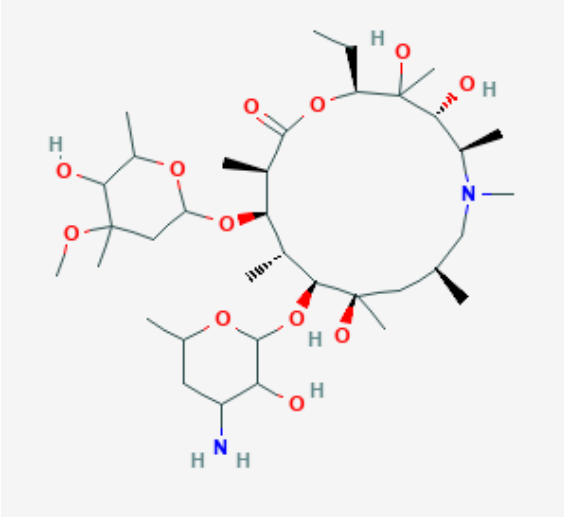
Onečišćenje	Relativni faktor odgovora detektora (RRF, F2)
L	0,43
M	1,70
E	1,00
F	3,80
J	1,00
D	1,00
I	1,00
C	1,00
H (Gx)	11,80
N	1,50
A	1,00
P	1,00
Azitromicin	-

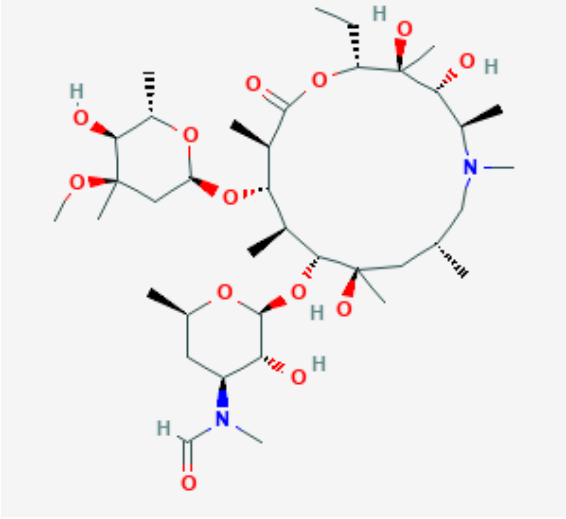
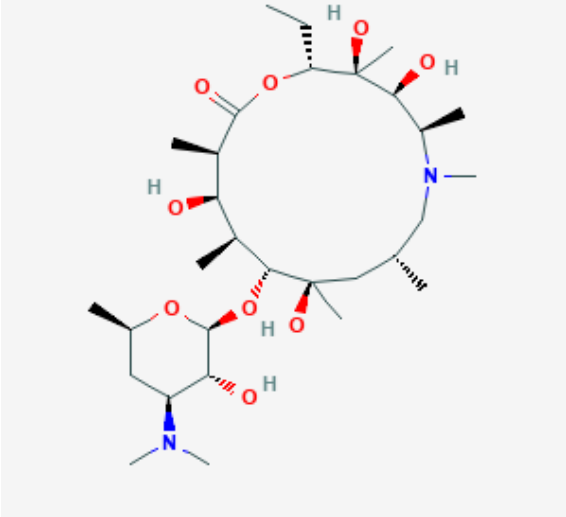
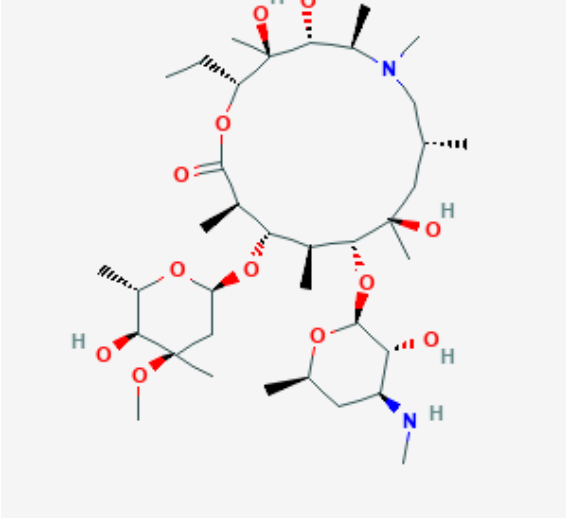
O	1,00
G	1,00
B	1,00
Ostala onečišćenja	1,00

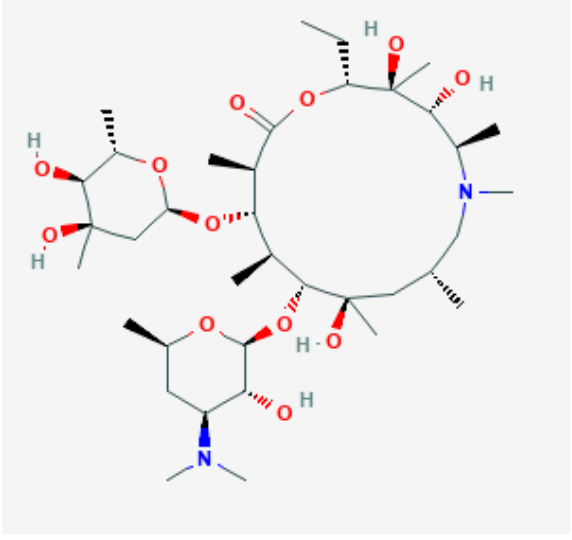
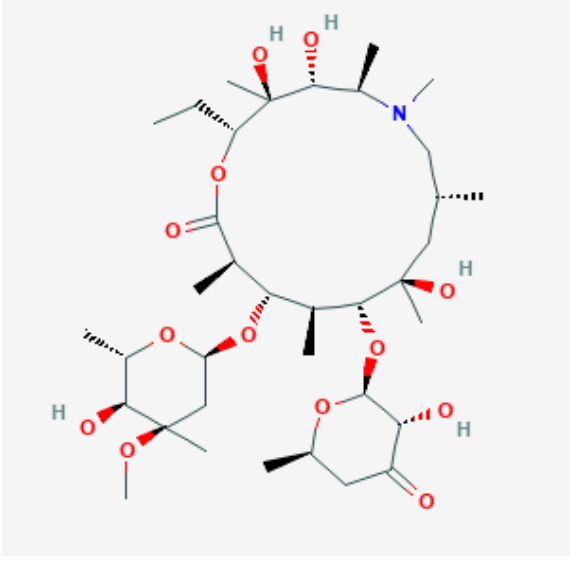
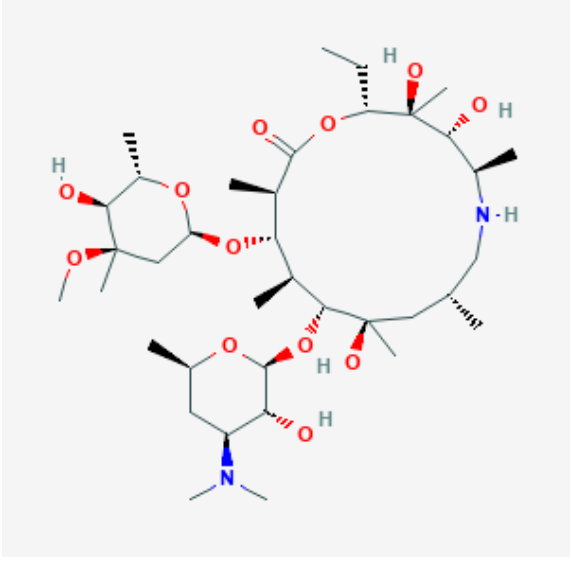
Tablica 3. Relativni faktor odgovora detektora za onečišćenja azitromicin tableta.

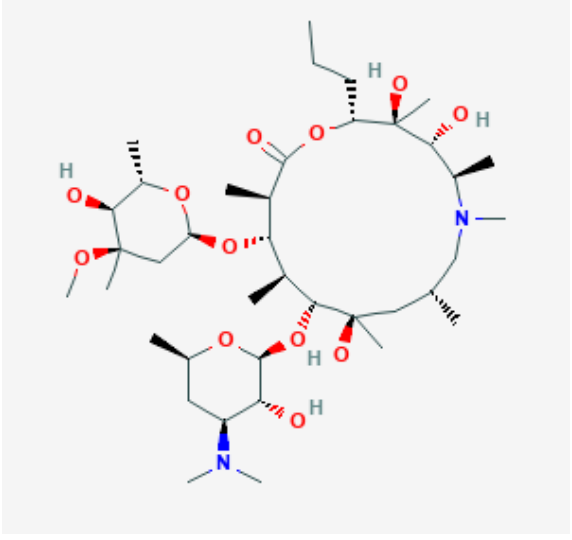
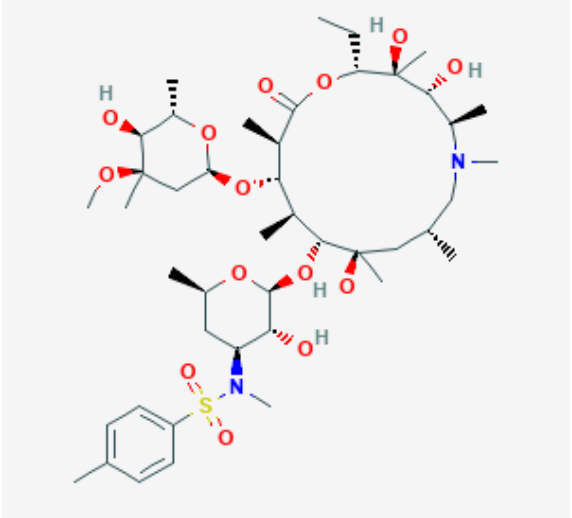
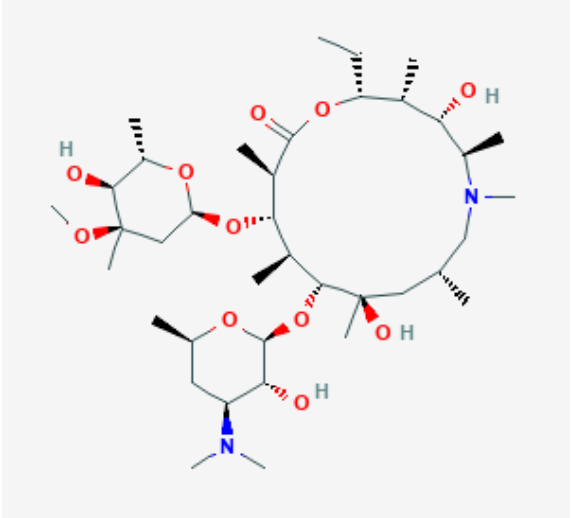
Strukturne formule i kemijski nazivi onečišćenja prisutnih u tabletama azitromicina prikazani su u Tablici 4. Onečišćenje P nema poznatu strukturu, CAS broj, molekulsku masu niti molekulsku formulu. Kemijski nazivi i strukture su preuzeti iz baze podataka pretraživanjem CAS (*chemical abstract service*) brojeva [22].

<p style="text-align: center;">Azitromicin</p> <p style="text-align: center;">(2<i>R</i>,3<i>S</i>,4<i>R</i>,5<i>R</i>,8<i>R</i>,10<i>R</i>,11<i>R</i>,12<i>S</i>,13<i>S</i>,14<i>R</i>)-11- [(2<i>S</i>,3<i>R</i>,4<i>S</i>,6<i>R</i>)-4-(dimethylamino)-3-hydroxy-6- methyloxan-2-yl]oxy-2-ethyl-3,4,10-trihydroxy-13- [(2<i>R</i>,4<i>R</i>,5<i>S</i>,6<i>S</i>)-5-hydroxy-4-methoxy-4,6-dimethyloxan-2- yl]oxy-3,5,6,8,10,12,14-heptamethyl-1-oxa-6- azacyclopentadecan-15-one;dihydrate</p> <p style="text-align: center;">CAS-117772-70-0</p>	
--	--

<p>Azitromicin N-oksid</p> <p>(onečišćenje L)</p> <p>(2S,3R,4S,6R)-2- [[[(2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-2-ethyl-3,4,10-trihydroxy-13-[(2R,4R,5S,6S)-5-hydroxy-4-methoxy-4,6-dimethyloxan-2-yl]oxy-3,5,6,8,10,12,14-heptamethyl-15-oxo-1-oxa-6-azacyclopentadec-11-yl]oxy]-3-hydroxy-N,N,6-trimethyloxan-4-amine oxide</p> <p>CAS-90503-06-3</p>	
<p>3'-(N,N-didemetil)-3'-N-formilazitromicin</p> <p>(Onečišćenje M)</p> <p>N-[2-[[[(2S,4R,5R,8S,10R,11S,12R,13R,14R)-2-ethyl-3,4,10-trihydroxy-13-(5-hydroxy-4-methoxy-4,6-dimethyloxan-2-yl)oxy-3,5,6,8,10,12,14-heptamethyl-15-oxo-1-oxa-6-azacyclopentadec-11-yl]oxy]-3-hydroxy-6-methyloxan-4-yl]formamide</p> <p>CAS-765927-71-7</p>	
<p>3'-(N,N-didemetil)azitromicin</p> <p>(Onečišćenje E)</p> <p>(2S,4R,5R,8S,10R,11S,12R,13R,14R)-11-(4-amino-3-hydroxy-6-methyloxan-2-yl)oxy-2-ethyl-3,4,10-trihydroxy-13-(5-hydroxy-4-methoxy-4,6-dimethyloxan-2-yl)oxy-3,5,6,8,10,12,14-heptamethyl-1-oxa-6-azacyclopentadecan-15-one</p> <p>CAS-612069-27-9</p>	

<p>3'-(N-demetil)-3'-N-formilazitromicin</p> <p>(Onečišćenje F)</p> <p><i>N</i>-[(2<i>S</i>,3<i>R</i>,4<i>S</i>,6<i>R</i>)-2- [[[(2<i>R</i>,3<i>S</i>,4<i>R</i>,5<i>R</i>,8<i>R</i>,10<i>R</i>,11<i>R</i>,12<i>S</i>,13<i>S</i>,14<i>R</i>)-2-ethyl-3,4,10- trihydroxy-13-[(2<i>R</i>,4<i>R</i>,5<i>S</i>,6<i>S</i>)-5-hydroxy-4-methoxy-4,6- dimethyloxan-2-yl]oxy-3,5,6,8,10,12,14-heptamethyl-15- oxo-1-oxa-6-azacyclopentadec-11-yl]oxy]-3-hydroxy-6- methyloxan-4-yl]-<i>N</i>-methylformamide</p> <p>CAS-612069-28-0</p>	
<p>Desozaminilazitromicin</p> <p>(Onečišćenje J)</p> <p>(2<i>R</i>,3<i>S</i>,4<i>S</i>,5<i>R</i>,8<i>R</i>,10<i>R</i>,11<i>R</i>,12<i>S</i>,13<i>R</i>,14<i>R</i>)-11- [(2<i>S</i>,3<i>R</i>,4<i>S</i>,6<i>R</i>)-4-(dimethylamino)-3-hydroxy-6- methyloxan-2-yl]oxy-2-ethyl-3,4,10,13-tetrahydroxy- 3,5,6,8,10,12,14-heptamethyl-1-oxa-6- azacyclopentadecan-15-one</p> <p>CAS-117693-41-1</p>	
<p>3'-N-demetilazitromicin</p> <p>(Onečišćenje I)</p> <p>(2<i>R</i>,3<i>S</i>,4<i>R</i>,5<i>R</i>,8<i>R</i>,10<i>R</i>,11<i>R</i>,12<i>S</i>,13<i>S</i>,14<i>R</i>)-2-ethyl-3,4,10- trihydroxy-13-[(2<i>R</i>,4<i>R</i>,5<i>S</i>,6<i>S</i>)-5-hydroxy-4-methoxy-4,6- dimethyloxan-2-yl]oxy-11-[(2<i>S</i>,3<i>R</i>,4<i>S</i>,6<i>R</i>)-3-hydroxy-6- methyl-4-(methylamino)oxan-2-yl]oxy-3,5,6,8,10,12,14- heptamethyl-1-oxa-6-azacyclopentadecan-15-one</p> <p>CAS-172617-84-4</p>	

<p style="text-align: center;">Azitromicin C</p> <p style="text-align: center;">(Onečišćenje C)</p> <p style="text-align: center;">(2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-13- [(2R,4R,5S,6S)-4,5-dihydroxy-4,6-dimethyloxan-2-yl]oxy- 11-[(2S,3R,4S,6R)-4-(dimethylamino)-3-hydroxy-6- methyloxan-2-yl]oxy-2-ethyl-3,4,10-trihydroxy- 3,5,6,8,10,12,14-heptamethyl-1-oxa-6- azacyclopentadecan-15-one</p> <p style="text-align: center;">CAS- N/A</p>	
<p style="text-align: center;">3'-de(dimetilamino)-3'-oksoazitromicin</p> <p style="text-align: center;">(Onečišćenje N)</p> <p style="text-align: center;">(2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-2-ethyl-3,4,10- trihydroxy-13-[(2R,4R,5S,6S)-5-hydroxy-4-methoxy-4,6- dimethyloxan-2-yl]oxy-11-[(2S,3S,6R)-3-hydroxy-6-methyl- 4-oxooxan-2-yl]oxy-3,5,6,8,10,12,14-heptamethyl-1-oxa-6- azacyclopentadecan-15-one</p> <p style="text-align: center;">CAS-612069-25-7</p>	
<p style="text-align: center;">Azaeritromicin A</p> <p style="text-align: center;">(Onečišćenje A)</p> <p style="text-align: center;">(2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-11- [(2S,3R,4S,6R)-4-(dimethylamino)-3-hydroxy-6- methyloxan-2-yl]oxy-2-ethyl-3,4,10-trihydroxy-13- [(2R,4R,5S,6S)-5-hydroxy-4-methoxy-4,6-dimethyloxan-2- yl]oxy-3,5,8,10,12,14-hexamethyl-1-oxa-6- azacyclopentadecan-15-one</p> <p style="text-align: center;">CAS-76801-85-9</p>	

<p>2-desetil-2-propilazitromicin</p> <p>(Onečišćenje O)</p> <p><i>(2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-11-[[(2S,3R,4S,6R)-4-(dimethylamino)-3-hydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxy-3,4,10-trihydroxy-13-[(2R,4R,5S,6S)-5-hydroxy-4-methoxy-4,6-dimethyloxan-2-yl]oxy-3,5,6,8,10,12,14-heptamethyl-2-propyl-1-oxa-6-azacyclopentadecan-15-one</i></p> <p>CAS-763924-54-5</p>	
<p>3'-N-demetil-3'-N-[(4-metilfenil)sulfonyl] azitromicin</p> <p>(Onečišćenje G)</p> <p><i>N-[(2S,3R,4S,6R)-2-[[(2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-2-ethyl-3,4,10-trihydroxy-13-[(2R,4R,5S,6S)-5-hydroxy-4-methoxy-4,6-dimethyloxan-2-yl]oxy-3,5,6,8,10,12,14-heptamethyl-15-oxo-1-oxa-6-azacyclopentadec-11-yl]oxy]-3-hydroxy-6-methyloxan-4-yl]-N,4-dimethylbenzenesulfonamide</i></p> <p>CAS-612069-31-5</p>	
<p>Azitromicin B</p> <p>(Onečišćenje B)</p> <p><i>(2R,3R,4S,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-11-[[(2S,3R,4S,6R)-4-(dimethylamino)-3-hydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxy-2-ethyl-4,10-dihydroxy-13-[(2R,4R,5S,6S)-5-hydroxy-4-methoxy-4,6-dimethyloxan-2-yl]oxy-3,5,6,8,10,12,14-heptamethyl-1-oxa-6-azacyclopentadecan-15-one</i></p> <p>CAS-307974-61-4</p>	

Tablica 4. Prikaz onečišćenja prisutnih u tabletama azitromicina.

1.6 Stabilitetna ispitivanja

Stabilitetna ispitivanja su danas jedna od najvažnijih dijelova farmaceutskog razvoja nove molekule i nove farmaceutske formulacije. Stabilitetna ispitivanja se provode da se utvrde uvjeti skladištenja i rok valjanosti lijeka koji se onda navodi na pakiranju lijeka. Lijek mora biti siguran i djelotvoran za cijelo vrijeme roka valjanosti.

Regulatorni zahtjevi postaju sve stroži, a sve s ciljem da se utvrde svi uvjeti pod kojima se lijek može naći za vrijeme svojega roka valjanosti. Prema tome, stabilitetna ispitivanja za vrijeme razvoja lijeka moraju biti u skladu sa znanstvenim načelima i regulatornim zahtjevima za pojedinu klimatsku zonu [23].

Stabilitetna ispitivanja farmaceutskog dozirnog oblika se u laboratorijima Kontrole kvalitete provode prema internim propisima. Na primjer, stabilitetna ispitivanja tableta azitromicina se provode nakon 3, 6, 9, 12, 18 i 24 mjeseca. Uzorak je pohranjen u stabilitetnim komorama na temperaturi od $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ i $60\pm 5\%$ relativne vlage. Nakon propisanog vremena, vadi se iz komore i upućuje u laboratorij na analizu.

Jedna od analiza je i analiza onečišćenja. Prikaz sadržaja specificiranih onečišćenja za nasumično odabrani uzorak tableta azitromicina 250 mg dan je u Tablici 5.

Vidljiv je porast razgradnih onečišćenja tijekom vremena, ali je jasno da je uzorak kvalitetan i siguran za cijelo vrijeme roka valjanosti.

Onečišćenje	Zahtjev specifikacije	Gotovi proizvod	3 mjeseca	6 mjeseci	9 mjeseci	12 mjeseci	18 mjeseci	24 mjeseca
Onečišćenje L	≤1.04%	<0.05%	<0.05%	0.06%	0.08%	0.14%	0.21%	0.25%
Onečišćenje M	≤1.04%	0.06%	<0.05%	<0.05%	0.13%	0.20%	0.34%	0.41%
Onečišćenje E	≤0.54%	<0.05%	<0.05%	<0.05%	<0.05%	<0.05%	<0.05%	<0.05%
Onečišćenje J	≤0.54%	0.14%	0.15%	0.15%	0.15%	0.12%	0.13%	0.17%
Onečišćenje F	≤1.04%	0.05%	<0.05%	0.05%	0.09%	0.14%	0.20%	0.25%
Onečišćenje I	≤0.74%	0.06%	<0.05%	0.15%	0.09%	0.22%	0.16%	0.20%
Onečišćenje N	≤1.04%	<0.05%	<0.05%	<0.05%	0.07%	0.12%	0.21%	0.26%
Ostala nespecificirana onečišćenja	≤0.24%	0.10%	0.11%	0.06%	0.10%	0.06%	0.10%	0.11%
Ukupna onečišćenja	≤5.04%	0.59%	0.42%	0.60%	0.90%	1.19%	1.53%	1.85%

Tablica 5. Prikaz kretanja vrijednosti sadržaja specificiranih onečišćenja za nasumično odabrani uzorak tableta azitromicina 250 mg.

2. Cilj istraživanja

Azitromicin je makrolidni antibiotik i djelatna je komponenta različitih farmaceutskih oblika, tableta, kapsula, injekcija i sirupa. Jedna od analiza koja se provodi u kontroli kvalitete svih farmaceutskih oblika azitromicina je određivanje onečišćenja. Specifikacija za farmaceutski oblik azitromicina propisuje maksimalnu količinu pojedinih onečišćenja i metodu za njihovo određivanje. Sve metode za analizu onečišćenja u farmaceutskim proizvodima azitromicina su kromatografske i koriste HPLC instrumente s prikladnim detektorima.

U ovom radu su objašnjene i opisane kromatografske metode za analizu proizvoda azitromicina koje se koriste u kontroli njihove kvalitete. Prikazane su sličnosti i razlike navedenih metoda te je objašnjeno kako se to može iskoristiti u svakodnevnom radu za veću efikasnost laboratorija. Objašnjene su specifičnosti pojedinih metoda i kako se u pojedinim slučajevima postiže prikladnost sustava. Metode su uspoređene s farmakopejskim metodama i prikazane su prednosti u odnosu na opisane farmakopejske metode.

3.1 Metoda za analizu onečišćenja u tabletama azitromicina

Razvijene su dvije formulacije tableta u kojima je djelatna komponenta azitromicin. Tablete s azitromicin monohidratom namijenjene su za američko tržište, dok su tablete s azitromicin dihidratom za europsko tržište. Sukladno tome, postoje dvije analitičke metode, jedna za analizu onečišćenja u tabletama s azitromicin dihidratom, a druga za analizu onečišćenja u tabletama s azitromicin monohidratom.

3.1.1. Metoda za analizu onečišćenja u tabletama azitromicin dihidrata (sve doze – 125 mg, 250 mg, 500 mg)

Za provođenje analize su potrebni HPLC instrument s UV detektorom (VWD ili DAD) i C18 kolona dimenzija 250 mm × 4,6 mm s veličinom čestica punila od 5 µm.

Brzina protoka mobilne faze je 0,8 mL/min. Detekcija se vrši na valnoj duljini od 210 nm, a temperatura kolone je 60°C. Elucija je gradijentna prema sljedećoj tablici:

Vrijeme (min)	Mobilna faza "A" (%)	Mobilna faza "B" (%)
0	50	50
25	45	55
30	40	60
80	25	75
81	50	50
93	50	50

Mobilna faza "A" je otopina Na_2HPO_4 u vodi, pH=8,9.

Mobilna faza "B" je smjesa acetonitrila i metanola u omjeru 3:1.

Potrebni su i standard azitromicina s deklariranim sadržajem, standard azaeritromicina i smjese poznatih onečišćenja - *Azithromycin for peak identification CRS Ph.Eur* i *Azithromycin for system suitability CRS Ph.Eur*.

Za analizu je potrebno pripremiti dvije otopine standarda azitromicina, koncentracije 0,02 mg/mL (kalibracijska otopina) i LOQ otopinu razrjeđivanjem standardne otopine azitromicina tako da se dobije koncentracija azitromicina od 0,004 mg/mL.

Potrebno je pripremiti otopinu za ispitivanje prikladnosti sustava (SST otopina) koja sadrži dvije komponente: azaeritromicin i azitromicin u koncentraciji od 0,02 mg/mL.

Potrebno je pripremiti otopinu za identifikaciju pikova onečišćenja. Za pripremu se koriste *Azithromycin for peak identification CRS Ph. Eur* (sadrži onečišćenja A, B, C, E, F, G, I, J, L, M, N, O, P) i *Azithromycin for system suitability CRS Ph. Eur* (sadrži onečišćenja F, J, H).

Priprema otopine uzorka započinje usitnjavanjem tableta u sitni prah, vaganjem u prikladnu tikvicu i otapanjem. Otopina se filtrira i razrijedi da se dobije koncentracija azitromicina od 4 mg/mL. Uzorci se pripremaju neposredno prije injektiranja.

Prije provođenja analize je potrebno provjeriti prikladnost sustava. Provjera prikladnosti sustava uključuje sljedeće:

- na kromatogramu slijepe probe ne smiju biti prisutni pikovi koji se preklapaju s pikovima onečišćenja

- na kromatogramu otopine za identifikaciju pikova svi pikovi moraju biti razdvojeni
- na kromatogramu SST otopine rezolucija azaeritromicina i azitromicina mora biti najmanje 2.5
- na kromatogramu otopine standarda faktor simetrije (*tailing*) pika azitromicina ne smije biti veći od 1.5
- omjer signala i šuma na kromatogramu LOQ otopine mora biti najmanje 10
- relativna standardna devijacija injektiranja kalibracijskih otopina mora biti manja od 10.0%.

Kromatografski pikovi se identificiraju uz pomoć sljedeće tablice:

Onečišćenje	Relativno retencijsko vrijeme (RRT)	Relativni faktor odgovora detektora (RRF)
L	0,24	0,43
M	0,29	1,70
E	0,38	1,00
F	0,52	3,80
J	0,56	1,00
D	0,56	1,00
I	0,58	1,00
C	0,73	1,00
H (Gx)	0,75	11,80

N	0,77	1,50
A	0,83	1,00
P	0,91	1,00
Azitromicin	1,00	-
O	1,23	1,00
G	1,26	1,00
B	1,32	1,00
Ostala onečišćenja	-	1,00

Onečišćenja A, D, H (Gx), O, G i B su onečišćenja iz postupka sinteze koja se ne zbrajaju u sumu onečišćenja.

3.1.2. Metoda za analizu onečišćenja u tabletama azitromicin monohidrata (sve doze – 250 mg, 500 mg, 600 mg)

Za provođenje analize su potrebni HPLC instrument s UV detektorom (DAD) i C18 kolona dimenzija 250 mm × 4,6mm i veličine čestica punila od 5 µm.

Brzina protoka mobilne faze je 0,8 mL/min, detekcija se vrši na valnoj duljini od 210 nm, a temperatura kolone je 60°C.

Eluacija je gradijentna prema sljedećoj tablici:

Vrijeme (min)	Mobilna faza "A" (%)	Mobilna faza "B" (%)
0	50	50
25	45	55
30	40	60
80	25	75
81	50	50
93	50	50

Mobilna faza "A" je otopina Na_2HPO_4 u vodi, pH=8,9.

Mobilna faza "B" je mješavina acetonitrila i metanola u omjeru 3:1.

Potrebni su i standard azitromicina s deklariranim sadržajem, standard azaeritromicina, smjese poznatih onečišćenja - *Azithromycin identification mixture RS USP* , *Azithromycin for system suitability CRS Ph. Eur* , onečišćenje Gy i marker, uzorak koji sadrži Gy onečišćenje i nepoznato onečišćenje. Umjesto *Azithromycin identification mixture RS USP* može se koristiti i *Azithromycin for peak identification CRS Ph. Eur*.

Za analizu je potrebno pripremiti dvije otopine standarda azitromicina, koncentracije 0,02 mg/mL (kalibracijska otopina) i potrebno je pripremiti LOQ otopinu razrjeđivanjem standardne otopine azitromicina da se dobije koncentracija azitromicina od 0,004 mg/mL.

Potrebno je pripremiti SST otopinu. SST otopina sadrži dvije komponente: azaeritromicin i azitromicin u koncentraciji od 0,02 mg/mL.

Potrebno je pripremiti dvije otopine s kojima se identificiraju pikovi, *marker* otopinu i otopinu za identifikaciju pikova. *Marker* otopina se priprema otapanjem krutog markera s otapalom.

Za pripremu otopine za identifikaciju pikova prvo se pripremi Gy otopina (otopina onečišćenja Gy). U vialu *Azithromycin for system suitability CRS Ph. Eur* (sadrži onečišćenja F, J, H) se dodaje *Azithromycin identification mixture RS USP* (sadrži onečišćenja A, B, C, E, F, G, I, J, L, M, N, O, P) i smjesa se otopi s Gy otopinom.

Priprema otopine uzorka započinje usitnjavanjem tableta u sitni prah, vaganjem u prikladnu tikvicu i otapanjem. Otopina se filtrira i razrijedi da se dobije koncentracija azitromicina od 4 mg/mL. Uzorci se pripremaju neposredno prije injektiranja.

Prije pokretanja analize potrebno je provjeriti prikladnost sustava. Provjera prikladnosti sustava uključuje sljedeće:

- na kromatogramu slijepe probe ne smiju biti prisutni pikovi koji se preklapaju s pikovima onečišćenja
- na kromatogramima marker otopine i otopine za identifikaciju pikova svi pikovi moraju biti razdvojeni. Potrebno je obratiti pažnju na onečišćenje Gy. Onečišćenje Gy može eluirati zajedno s onečišćenjima u njegovoj neposrednoj blizini, a to je najčešće onečišćenje J. Za identifikaciju onečišćenja Gy usporede se kromatogrami na 210 nm i 265 nm. Onečišćenja G (G, Gx i Gy) apsorbiraju na 265 nm i navedena valna duljina pomaže pri njihovoj identifikaciji. Ukoliko

odvajanje nije uspješno potrebno je promijeniti srednji dio gradijenta i/ili temperaturu kolone.

- na kromatogramu SST otopine rezolucija azaeritromicina i azitromicina mora biti najmanje 2.5
- na kromatogramu otopine standarda faktor simetrije (*tailing*) pika azitromicina ne smije biti veći od 1.5
- omjer signala i šuma na kromatogramu LOQ otopine mora biti najmanje 10
- relativna standardna devijacija injektiranja kalibracijskih otopina mora biti manja od 10.0%.

Kromatografski pikovi se identificiraju uz pomoć sljedeće tablice:

Onečišćenje	Relativno retencijsko vrijeme (RRT)	Relativni faktor odgovora detektora (RRF)
L	0,30	0,43
M	0,39	1,70
E	0,44	1,00
F	0,53	3,80
Gy	0,56	11,00
J	0,58	1,00
I	0,60	1,00
C	0,74	1,00

H (Gx)	0,75	11,80
N	0,77	1,50
A	0,84	1,00
P	0,92	1,00
Azitromicin	1,00	-
O	1,22	1,00
G	1,25	1,00
B	1,32	1,00
Ostala onečišćenja	-	1,00

Onečišćenja A, H (Gx), Gy, O, G i B su onečišćenja iz postupka sinteze koja se ne zbrajaju u sumu onečišćenja.

3.2 Metoda za analizu onečišćenja u kapsulama azitromicina

Za razliku od tableta koje su na tržištu u obliku azitromicin monohidrata i azitromicin dihidrata i koje dolaze u više doza, kapsule su samo u obliku azitromicin dihidrata i dolaze u samo jednoj dozi od 250 mg.

Za provođenje analize su potrebni HPLC instrument s UV detektorom (VWD ili DAD) i C18 kolona dimenzija 250 mm × 4,6 mm i veličine čestica punila od 5 µm.

Brzina protoka mobilne faze je 0,8 mL/min, detekcija se vrši na valnoj duljini od 210 nm, a temperatura kolone je 60°C. Eluacija je gradijentna prema sljedećoj tablici:

Vrijeme (min)	Mobilna faza "A" (%)	Mobilna faza "B" (%)
0	50	50
25	45	55
30	40	60
80	25	75
81	50	50
93	50	50

Mobilna faza "A" je otopina Na₂HPO₄ u vodi, pH=8,9.

Mobilna faza "B" je mješavina acetonitrila i metanola u omjeru 3:1.

Potrebni su i standard azitromicina s deklariranim sadržajem, standard azaeritromicina i smjese poznatih onečišćenja - *Azithromycin identification mixture RS USP* i *Azithromycin for system suitability CRS Ph. Eur.* Umjesto *Azithromycin identification mixture RS USP* može se koristiti i *Azithromycin for peak identification CRS Ph. Eur.*

Za analizu je potrebno pripremiti dvije otopine standarada azitromicina (kalibracijske otopine) koncentracije 0,02 mg/mL.

Potrebno je pripremiti LOQ otopinu razrjeđivanjem standardne otopine azitromicina da se dobije koncentracija azitromicina od 0,004 mg/mL.

Potrebno je pripremiti SST otopinu. SST otopina sadrži dvije komponente: azaeritromicin i azitromicin u koncentraciji od 0,02 mg/mL.

Potrebno je pripremiti otopinu za identifikaciju pikova. Za pripremu se koriste *Azithromycin for peak identification CRS Ph. Eur* (sadrži onečišćenja A, B, C, E, F, G, I, J, L, M, N, O, P) i *Azithromycin for system suitability CRS Ph. Eur* (sadrži onečišćenja F, J, H).

Priprema uzorka za analizu započinje nasumičnim odabirom barem 10 kapsula i homogenizacijom njihovog sadržaja u tarioniku. Homogenizirani prah se važe u tikvicu i otapa. Otopina se filtrira i razrijedi da se dobije koncentracija azitromicina od 4 mg/mL. Uzorci se pripremaju neposredno prije injektiranja.

Prije provođenja analize potrebno je provjeriti prikladnost sustava. Provjera prikladnosti sustava uključuje sljedeće:

- na kromatogramu slijepe probe ne smiju biti prisutni pikovi koji se preklapaju s pikovima onečišćenja
- na kromatogramu otopine za identifikaciju pikova svi pikovi moraju biti razdvojeni
- na kromatogramu SST otopine rezolucija azaeritromicina i azitromicina mora biti najmanje 2.5
- na kromatogramu otopine standarda faktor simetrije (*tailing*) pika azitromicina ne smije biti veći od 1.5

- omjer signala i šuma na kromatogramu LOQ otopine mora biti najmanje 10
- relativna standardna devijacija injektiranja kalibracijskih otopina mora biti manja od 10.0%.

Kromatografski pikovi se identificiraju uz pomoć sljedeće tablice:

Onečišćenje	Relativno retencijsko vrijeme (RRT)	Relativni faktor odgovora detektora (RRF)
L	0,24	0,43
M	0,29	1,70
E	0,38	1,00
F	0,52	3,80
J	0,56	1,00
D	0,56	1,00
I	0,58	1,00
C	0,73	1,00
H (Gx)	0,75	11,80
N	0,77	1,50
A	0,83	1,00
P	0,91	1,00
Azitromicin	1,00	-

O	1,23	1,00
G	1,26	1,00
B	1,32	1,00
Ostala onečišćenja	-	1,00

Onečišćenja A, D, H(Gx), O, G i B su onečišćenja iz postupka sinteze koja se ne zbrajaju u sumu onečišćenja.

3.3. Metoda za analizu onečišćenja u injekcijama azitromicina

Slično kao i kapsule i azitromicin injekcije su na tržištu u samo jednoj dozi, ali za razliku od kapsula u dozi od 500 mg. Dolaze u obliku liofilizata koji se otapa vodom prije primjene.

Za provođenje analize su potrebni HPLC instrument s UV detektorom (VWD ili DAD) i C18 kolona dimenzija 250 mm × 4,6 mm i veličine čestica punila od 5 µm.

Brzina protoka mobilne faze je 0,8 mL/min, detekcija se vrši na valnoj duljini od 210 nm, a temperatura kolone je 60°C. Elucija je gradijentna prema sljedećoj tablici:

Vrijeme (min)	Mobilna faza "A" (%)	Mobilna faza "B" (%)
0	50	50
25	45	55
30	40	60

80	25	75
81	50	50
93	50	50

Mobilna faza "A" je otopina Na₂HPO₄ u vodi, pH=8,9.

Mobilna faza "B" je mješavina acetonitrila i metanola u omjeru 3:1.

Potrebni su i standard azitromicina s deklariranim sadržajem, standard azaeritromicina i smjese poznatih onečišćenja - *Azithromycin identification mixture RS USP* i *Azithromycin for system suitability CRS Ph. Eur.* Umjesto *Azithromycin identification mixture RS USP* može se koristiti i *Azithromycin for peak identification CRS Ph. Eur.*

Potrebno je pripremiti SST otopinu. SST otopina sadrži azitromicin u koncentraciji od 0,02 mg/mL. Potrebno je pripremiti otopinu za identifikaciju pikova. Za pripremu se koriste *Azithromycin for peak identification CRS Ph. Eur* (sadrži onečišćenja A, B, C, E, F, G, I, J, L, M, N, O, P) i *Azithromycin for system suitability CRS Ph. Eur* (sadrži onečišćenja F, J, H).

Uzorak se pripremi tako da se uzme jedna bočica i otopi s 4,8 mL vode. Razrijedi se 25 puta i analizira razrijeđena otopina. Otopina je stabilna 14 sati.

Prije analize je potrebno provjeriti prikladnost sustava. Provjera prikladnosti sustava uključuje sljedeće:

- na kromatogramu slijepe probe ne smiju biti prisutni pikovi koji se preklapaju s pikovima onečišćenja

- na kromatogramu otopine za identifikaciju pikova svi pikovi moraju biti razdvojeni
- dodatno, rezolucija između onečišćenja A i azitromicina mora biti najmanje 2.5
- na kromatogramu SST otopine faktor simetrije (*tailing*) pika azitromicina ne smije biti veći od 1.5
- omjer signala i šuma azitromicina na kromatogramu SST otopine mora biti najmanje 50

Kromatografski pikovi se identificiraju uz pomoć sljedeće tablice:

Onečišćenje	Relativno retencijsko vrijeme (RRT)	Relativni faktor odgovora detektora (RRF)
L	0,30	0,43
M	0,39	1,70
E	0,44	1,00
F	0,53	3,80
J	0,57	1,00
D	0,57	1,00
I	0,60	1,00
C	0,74	1,00
H (Gx)	0,75	11,80
N	0,77	1,50

A	0,84	1,00
P	0,92	1,00
Azitromicin	1,00	-
O	1,23	1,00
G	1,26	1,00
B	1,33	1,00
Ostala onečišćenja	-	1,00

Onečišćenja A, D, H (Gx), O, G i B su onečišćenja iz postupka sinteze koja se ne zbrajaju u sumu onečišćenja.

3.4. Metoda za analizu onečišćenja u sirupu azitromicina

Kao i u slučaju tableta razvijene su dvije formulacije sirupa. Jedna sadrži azitromicin dihidrat i primarno je namijenjena europskom tržištu. Druga formulacija sadrži azitromicin monohidrat i namijenjena je tržištu Sjedinjenih Američkih Država. Stoga su registrirane i dvije analitičke metode, jedna za određivanje onečišćenja u formulacijama s dihidratom, a druga za formulacije s monohidratom.

3.4.1. Metoda za analizu onečišćenja u sirupu azitromicin dihidrata (100 mg i 200 mg)

Za provođenje analize potrebni su HPLC instrument s EC detektorom, C18 kolona dimenzija 250 mm x 4,6 mm i veličine čestica punila od 5 µm.

Brzina protoka mobilne faze je 1,0 mL/min, a elucija je izokratna. Temperatura kolone je 40°C. Detekcija se vrši EC detektorom. Potencijal elektrode 1 se postavi na +0,70 V, a elektrode 2 na +0,82 V.

Mobilna faza se priprema miješanjem acetonitrila i fosfatnog pufera K₂HPO₄ u omjeru 46/54. pH je potrebno podesiti na 11,0.

Potrebni su i standardi azitromicina, desozaminilazitromicina i N-demetilazitromicina s potvrđenim sadržajem. Za analizu je potrebno pripremiti dvije otopine kalibracijskih standarada. Otopine kalibracijskog standarda sadrže 3 komponente. Desozaminilazitromicin (onečišćenje J) u koncentraciji 0.095 mg/mL, N-demetilazitromicin (onečišćenje I) u koncentraciji 0.23 mg/mL i azitromicin u koncentraciji od 0.32 mg/mL.

Priprema uzoraka počinje rekonstitucijom sirupa s vodom. Rekonstitucija se vrši dodavanjem vode u bočicu sa sirupom prema sljedećoj tablici:

Doza	Volumen vode
100 mg / 5 ml, 20 mL	12,0 mL
200 mg / 5 ml, 15 mL	9,5 mL
200 mg / 5 ml, 30 mL	16,5 mL
200 mg / 5 ml, 37,5 mL	20 mL

Sirup se mućka 1 sat i ostavi se termostatirati na sobnu temperaturu. 3 ml suspenzije se važe u tikvicu od 100 mL (doza 100 mg), odnosno tikvicu od 200 mL (doza 200 mg). Otopi se acetonitrilom i dopuni vodom do oznake. Filtrira se 0,45 µm filterom. Uzorci se pripremaju neposredno prije injektiranja.

Prije pokretanja analize je potrebno provjeriti prikladnost sustava. Provjera prikladnosti sustava uključuje sljedeće:

- na kromatogramu slijepe probe ne smiju biti prisutni pikovi koji se preklapaju s pikovima onečišćenja
- na kromatogramu standardnih otopina rezolucija između desozaminil-azitromicina i N-demetilazitromicina mora biti najmanje 1.5, faktor simetrije (*tailing*) sve 3 komponente ne smije biti veći od 2.0, a broj teoretskih tavana azitromicina mora biti najmanje 1500.
- relativna standardna devijacija injektiranja kalibracijskih otopina mora biti manja od 10.0%.

Kromatografski pikovi se identificiraju uz pomoć sljedeće tablice:

Onečišćenje	Relativno retencijsko vrijeme (RRT)	Porijeklo onečišćenja
Azitromicin N-oksid (L)	0.15	Degradacijsko
Eritromicin A iminoeter	0.20	Procesno
Onečišćenje E+M	0.25	Degradacijsko
Azitromicin F (D)	0.30	Procesno

Desozaminilazitromicin (J)	0.31	Degradacijsko
F	0.32	Degradacijsko
N-demetilazitromicin (I)	0.35	Degradacijsko
Eritromicin A oksim	0.42	Procesno
Azaeritromicin A (A)	0.63	Procesno
N	0.71	Degradacijsko
Gx (H)	0.83	Procesno
O	1.54	Procesno
Azitromicin B (B)	1.65	Procesno

Procesna (sintetska) onečišćenja se ne zbrajaju u sumu onečišćenja.

3.4.2. Metoda za analizu onečišćenja u sirupu azitromicin monohidrata (100 mg i 200 mg)

Za provođenje analize potrebni su HPLC instrument s EC detektorom, C18 kolona dimenzija 250 mm × 4,6 mm i veličine čestica punila od 5 µm.

Brzina protoka mobilne faze je 1,0 mL/min, a elucija je izokratna. Temperatura kolone je 40°C. Detekcija se vrši EC detektorom. Potencijal elektrode 1 se postavi na +0,70 V, a elektrode 2 na +0,82 V.

Mobilna faza se priprema miješanjem acetonitrila i fosfatnog pufera K₂HPO₄ u omjeru 46/54. pH je potrebno podesiti na 11.0.

Potrebni su i standardi azitromicina, desozaminilazitromicina i N-demetilazitromicina s potvrđenim sadržajem. Za analizu je potrebno pripremiti dvije otopine kalibracijskih standarada. Otopine kalibracijskog standarda sadrže 3 komponente. Desozaminilazitromicin (onečišćenje J) u koncentraciji 0.095 mg/mL, N-demetilazitromicin (onečišćenje I) u koncentraciji 0.23 mg/mL i azitromicin u koncentraciji od 0.32 mg/mL.

Pripreme se dvije otopine za provjeru limita kvantifikacije (LOQ otopine 1 i 2). Za prvu otopinu je potrebno pipetirati 2 mL otopine kalibracijskog standarda u tikvicu od 10 mL i dopuniti acetonitrilom i vodom do oznake. Druga otopina se pripremi pipetiranjem 1 mL otopine kalibracijskog standarda u tikvicu od 10 mL i dopuni se acetonitrilom i vodom do oznake.

Priprema uzoraka počinje rekonstitucijom sirupa s vodom. Rekonstitucija se vrši dodavanjem vode u bočicu sa sirupom prema sljedećoj tablici:

DOZA	Volumen vode
100 mg / 5 mL, 300 mg	9 mL
200 mg / 5 mL, 600 mg	9 mL
200 mg / 5 mL, 900 mg	12 mL
200 mg / 5 mL, 1200 mg	15 mL

Sirup se mučka 1 sat i ostavi se termostatirati na sobnu temperaturu. 3 ml suspenzije se važe u tikvicu od 100 mL (doza 100 mg), odnosno tikvicu od 200 mL (doza 200 mg).

Otopi se vodom i acetonitrilom, te dopuni vodom do oznake. Filtrira se 0,45 µm filterom. Uzorci se pripremaju neposredno prije injektiranja.

Prije pokretanja analize je potrebno provjeriti prikladnost sustava. Provjera prikladnosti sustava uključuje sljedeće:

- na kromatogramu slijepe probe ne smiju biti prisutni pikovi koji se preklapaju s pikovima onečišćenja
- na kromatogramu standardnih otopina rezolucija između desozaminilazitromicina i N-demetilazitromicina mora biti najmanje 1.5, faktor simetrije (*tailing*) sve 3 komponente ne smije biti veći od 1.7, a broj teoretskih tavana azitromicina mora biti najmanje 3000
- na kromatogramu otopine LOQ 1 se provjerava omjer signala i šuma (S/N) desozaminilazitromicina i N-demetilazitromicina i mora biti najmanje 10
- na kromatogramu otopine LOQ 2 se provjerava omjer signala i šuma (S/N) azitromicina i mora biti najmanje 10
- relativna standardna devijacija injektiranja kalibracijskih otopina mora biti manja od 10.0%.

Kromatografski pikovi se identificiraju uz pomoć sljedeće tablice:

Onečišćenje	Relativno retencijsko vrijeme (RRT)
Azitromicin N-oksid (L)	0.15
Eritromicin A iminoeter	0.20

Onečišćenje E+M	0.25
Azitromicin F (D)	0.30
Desozaminilazitromicin (J)	0.31
F	0.33
N-demetilazitromicin (I)	0.35
Eritromicin A oksim	0.42
Azaeritromicin A	0.64
N	0.74
Gx (H)	0.86
Azitromicin B	1.64
Azitromicin	1.00

Procesna (sintetska) onečišćenja se ne zbrajaju u sumu onečišćenja.

4. Rasprava

U prethodnom poglavlju su navedene metode za analizu onečišćenja azitromicinskih proizvoda koje se u trenutku pisanja ovoga rada redovno koriste u laboratorijima kontrole kvalitete kompanije Pliva Hrvatska d.o.o.

Sve metode su kromatografske i izvode se HPLC tehnikom. Odvajanjem sastavnica smjese i prolaskom istih kroz detektor dobije se kromatogram. Iz kromatograma, odnosno površina pikova i podataka o uzorcima i standardima kvantificiraju se onečišćenja. Dobiveni rezultat se vrednuje prema trenutno važećoj specifikaciji farmaceutskog oblika i zaključuje da li uzorak odgovara zahtjevu ili ne.

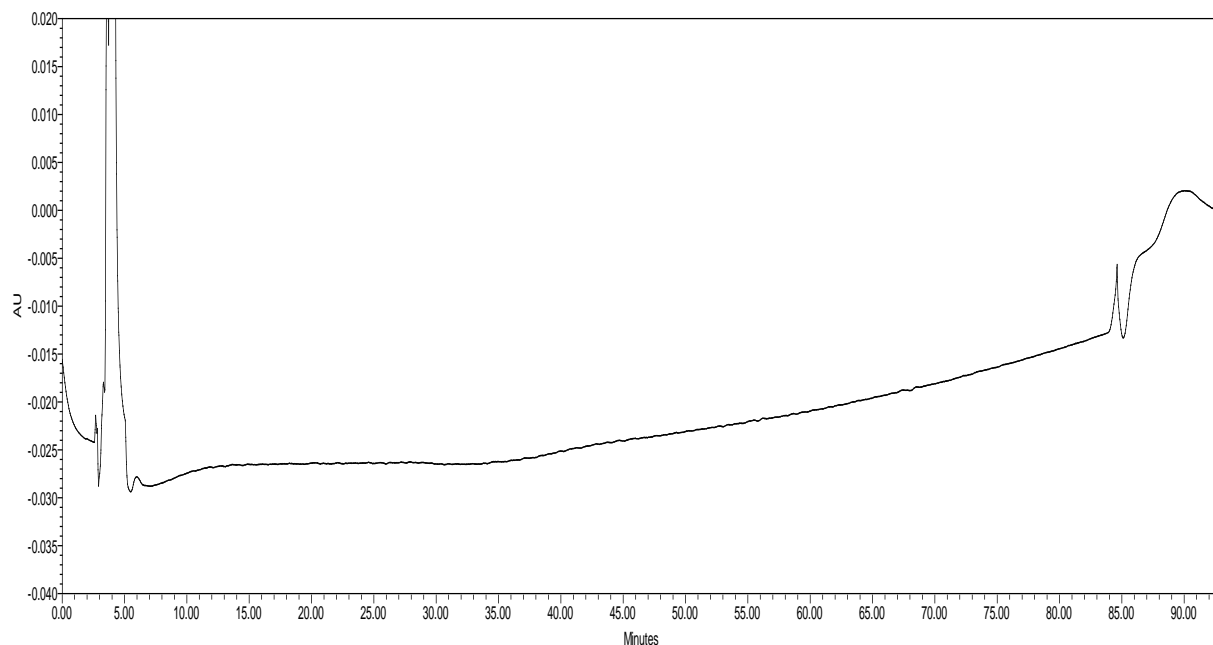
Sve metode za analizu onečišćenja farmaceutskih proizvoda azitromicina možemo podijeliti u dvije skupine. Prva skupina bi bile metode za analizu tableta azitromicin monohidrata i dihidrata te kapsula i injekcija azitromicina. Druga skupina bi bile metode za analizu sirupa azitromicin monohidrata i dihidrata. Metode su podijeljene u dvije skupine prema sličnosti same metode i sličnosti kromatograma.

U daljnjem tekstu će se prikazati tipični kromatogrami analiza onečišćenja azitromicinskih proizvoda. Započet će se s kromatogramima dobivenim metodom za analizu tableta azitromicin monohidrata i dihidrata.

4.1 Analitika onečišćenja u tabletama azitromicina (monohidrat i dihidrat)

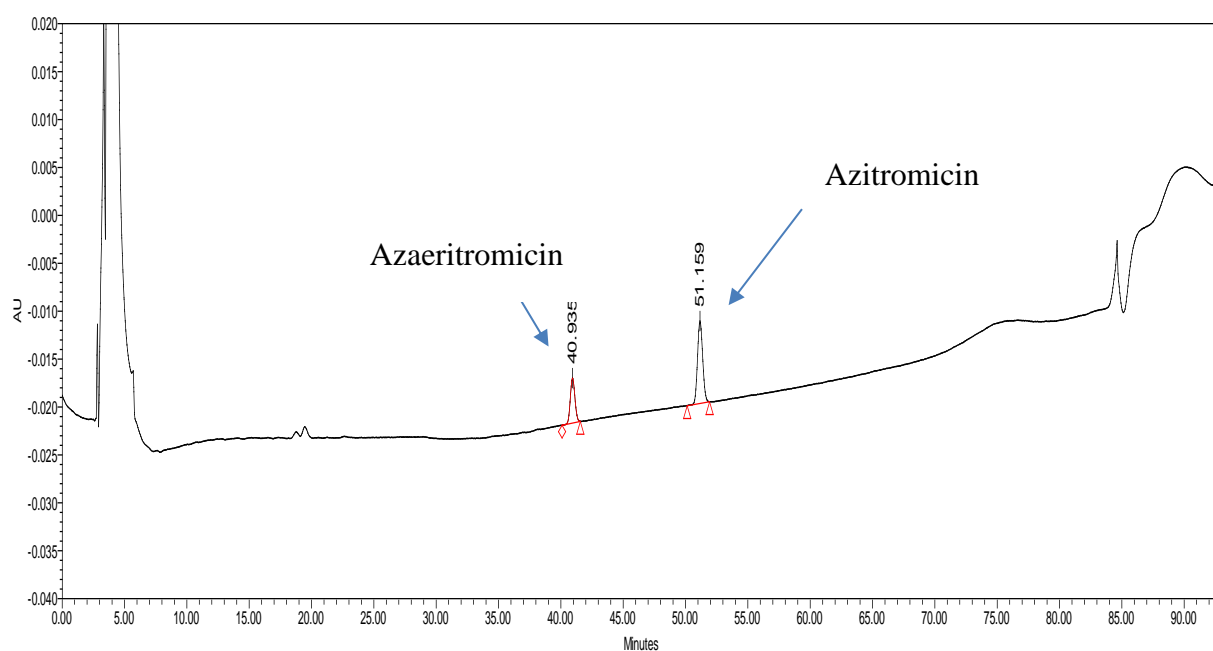
Prikazani su kromatogrami slijepe probe (Slika 2.), SST otopine za ispitivanje prikladnosti sustava (Slika 3.), LOQ otopine za određivanje limita kvantifikacije (Slika 4.) i kromatogram otopine standarda (Slika 5.). Prva četiri kromatograma su identična

za analize tableta azitromicin monohidrata i azitromicin dihidrata. Provjera slijepe probe, omjera signala i šuma, rezolucije i slaganja standarada (*recovery*) je identična za obje metode.



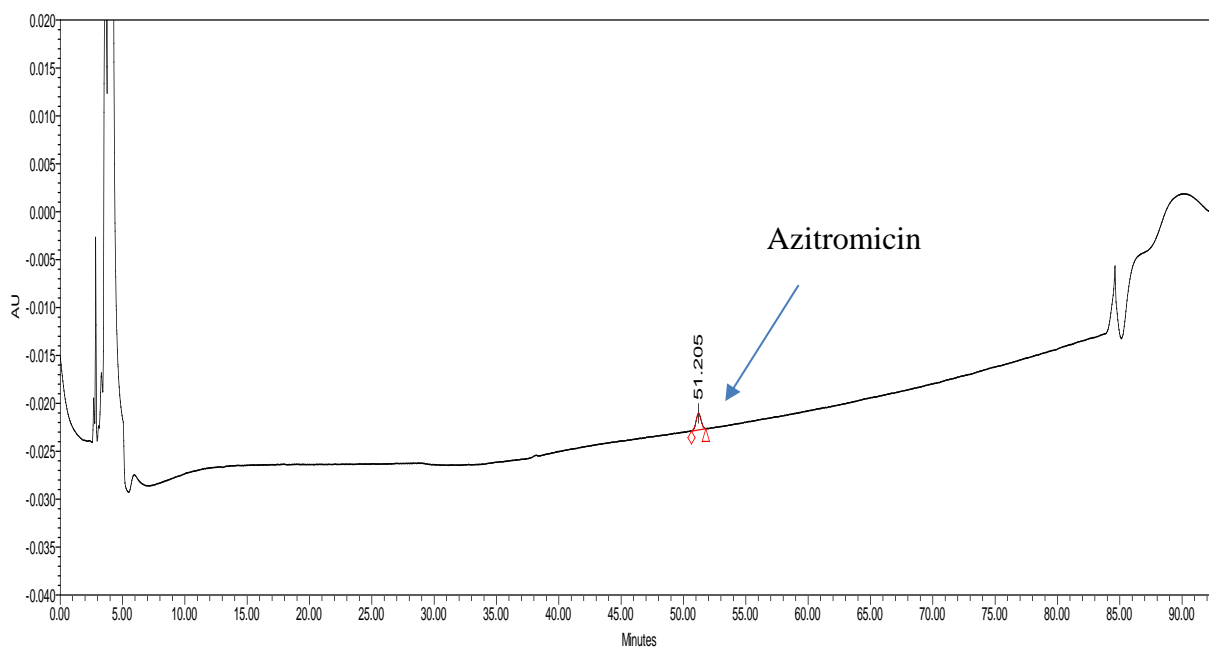
Slika 2. Kromatogram slijepe probe.

Na kromatogramu slijepe probe nema pikova koji mogu interferirati s pikovima onečišćenja azitromicina.



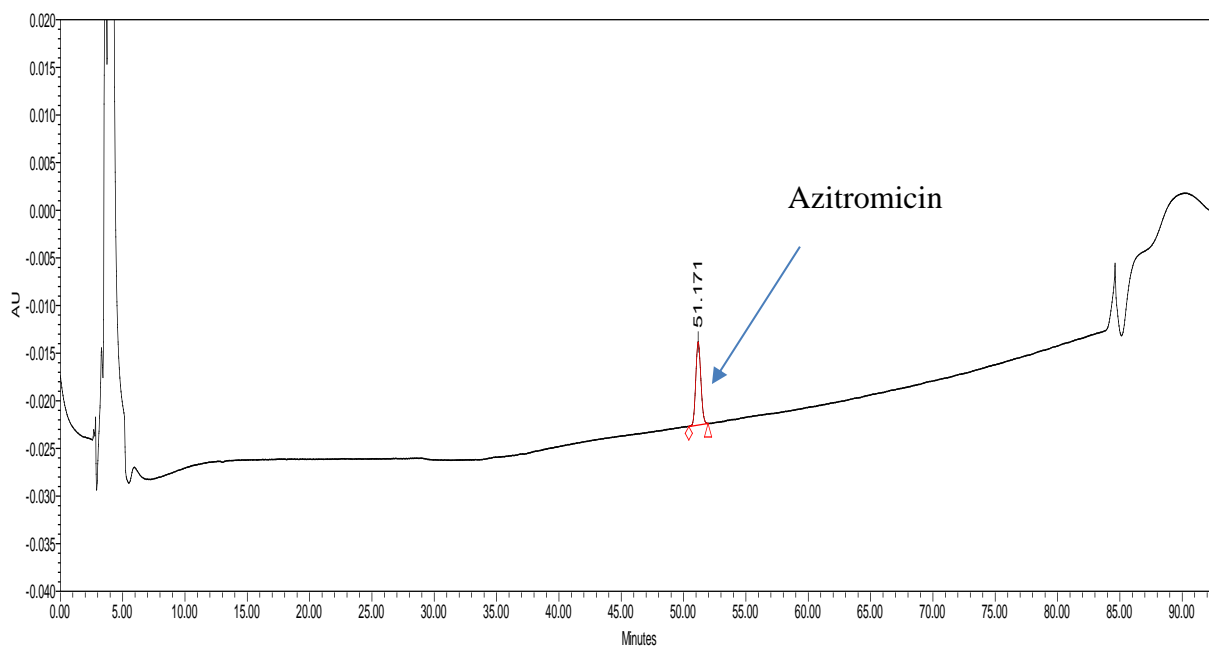
Slika 3. Kromatogram SST otopine.

Razlučivanje između kromatografskih pikova azaeritromicina (vrijeme zadržavanja 41 min) i azitromicina (vrijeme zadržavanja 51 min) je veća od 2.5.



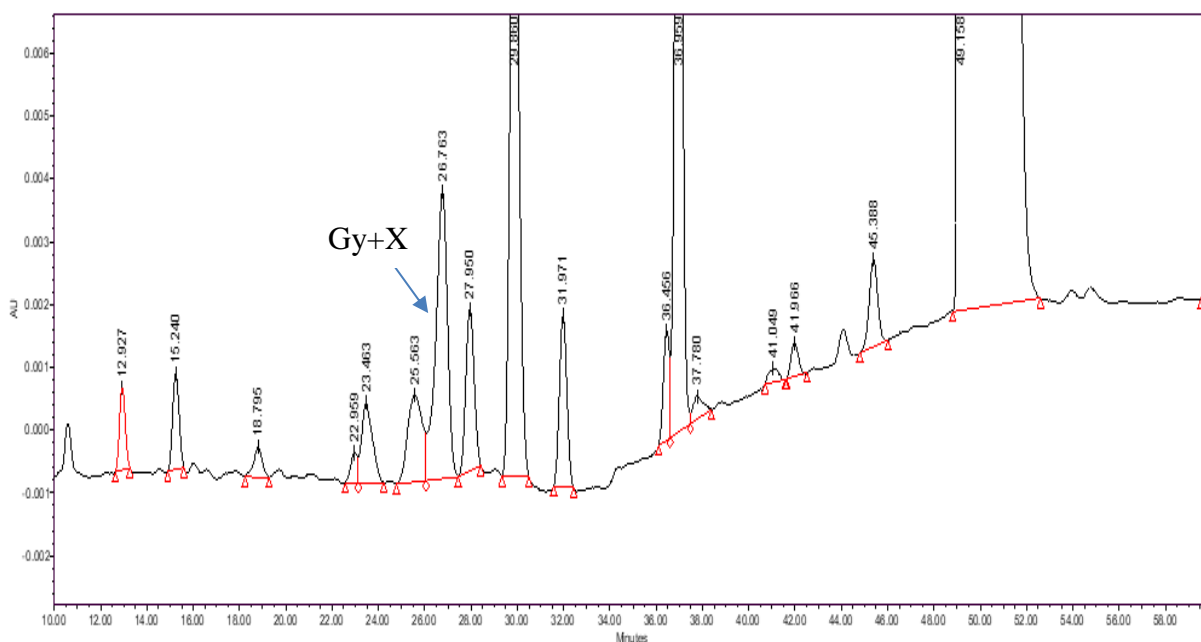
Slika 4. Kromatogram LOQ otopine.

Omjer signala azitromicina u LOQ otopini određene koncentracije i šuma je veći od 10.



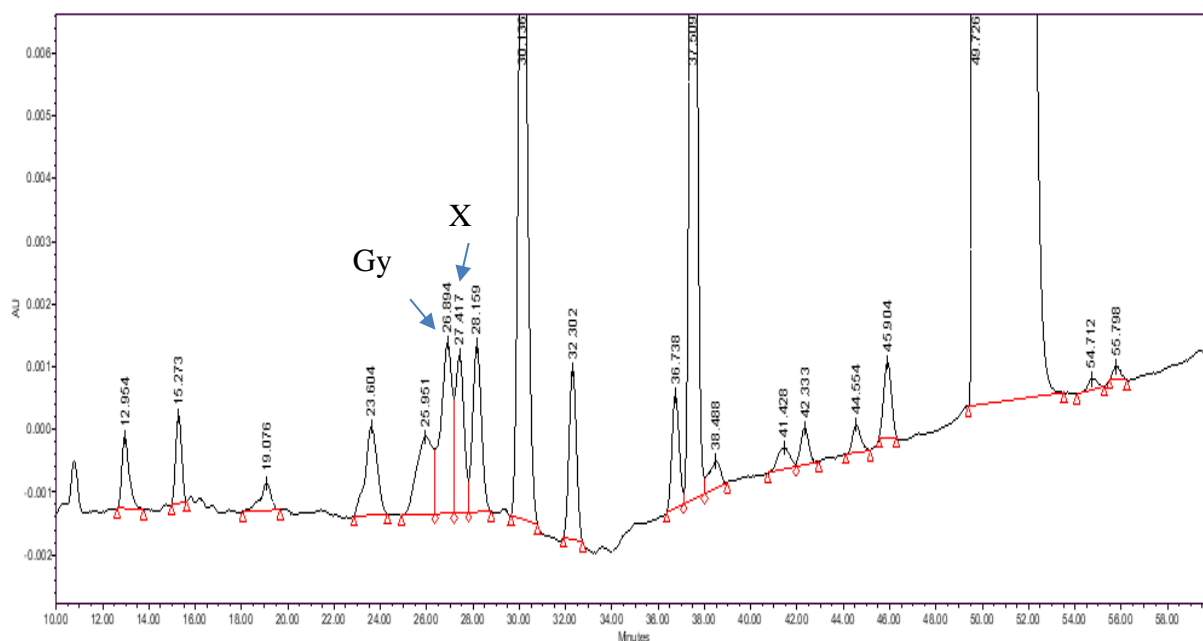
Slika 5. Kromatogram standardne otopine azitromicina.

Metoda za analizu onečišćenja u tabletama azitromicin monohidrata propisuje injektiranje marker otopine. Na kromatogramu marker otopine onečišćenje Gy i susjedna onečišćenja se moraju odvojiti od nepoznatoga onečišćenja u njihovoj neposrednoj blizini (Slika 6.). Ukoliko se ne odvoje, postoji mogućnost da će za vrijeme analize doći do ko-elucije onečišćenja Gy i nepoznatoga onečišćenja i da će se dobiti lažno veći rezultat. S obzirom da otopine za identifikaciju onečišćenja nemaju nepoznato onečišćenje nužno je injektirati marker otopinu. Marker otopina se priprema otapanjem uzorka za koji se zna da sadrži nepoznato onečišćenje u neposrednoj blizini onečišćenja Gy. Ukoliko se analiziraju tablete azitromicin dihidrata nije nužno injektirati marker otopinu, ali se preporuča.



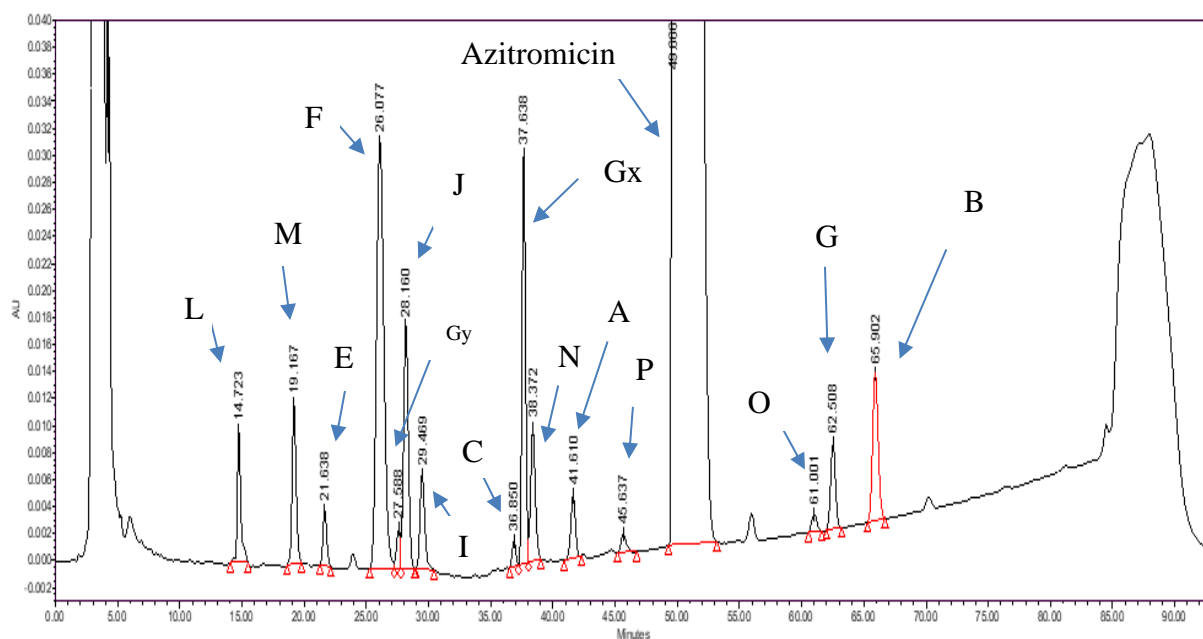
Slika 6. Primjer kromatograma injektiranja marker otopine gdje se onečišćenje Gy nije odvojilo od nepoznatoga onečišćenja X.

U slučaju da se onečišćenje Gy nije odvojilo od nepoznatog onečišćenja X potrebno je prilagoditi kromatografske uvjete da se dobije razdvajanje. Kromatogram prikazan na Slici 7. pokazuje postignuto odvajanje.

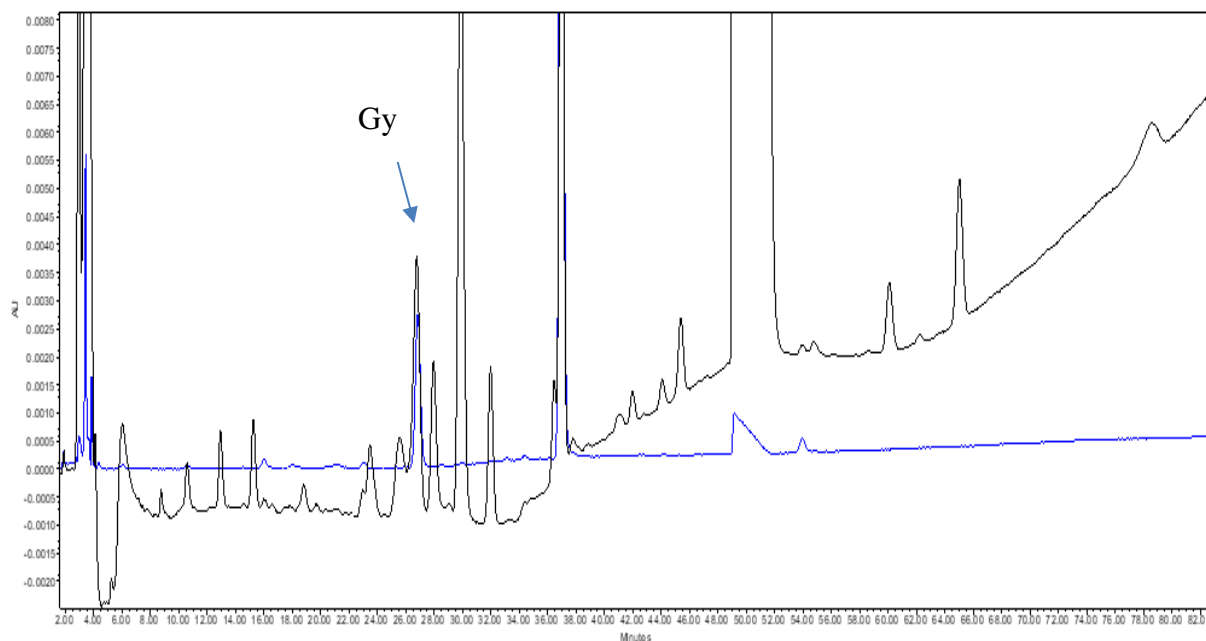


Slika 7. Primjer kromatograma injektiranja marker otopine gdje se je odvojilo onečišćenje Gy od nepoznatoga onečišćenja X.

Odvajanje se najčešće postiže podešavanjem temperature kolone na $60 \pm 3^\circ\text{C}$. Jasno se vide četiri pika umjesto 3, odnosno odvajanje Gy i X. Vidljivo je da je pik onečišćenja Gy odvojen od onečišćenja F i J (Slika 8.). Za točnu potvrdu koji pik je Gy pogleda se kromatogram na 265 nm gdje se Gy jasno vidi (Slike 9.-12.).

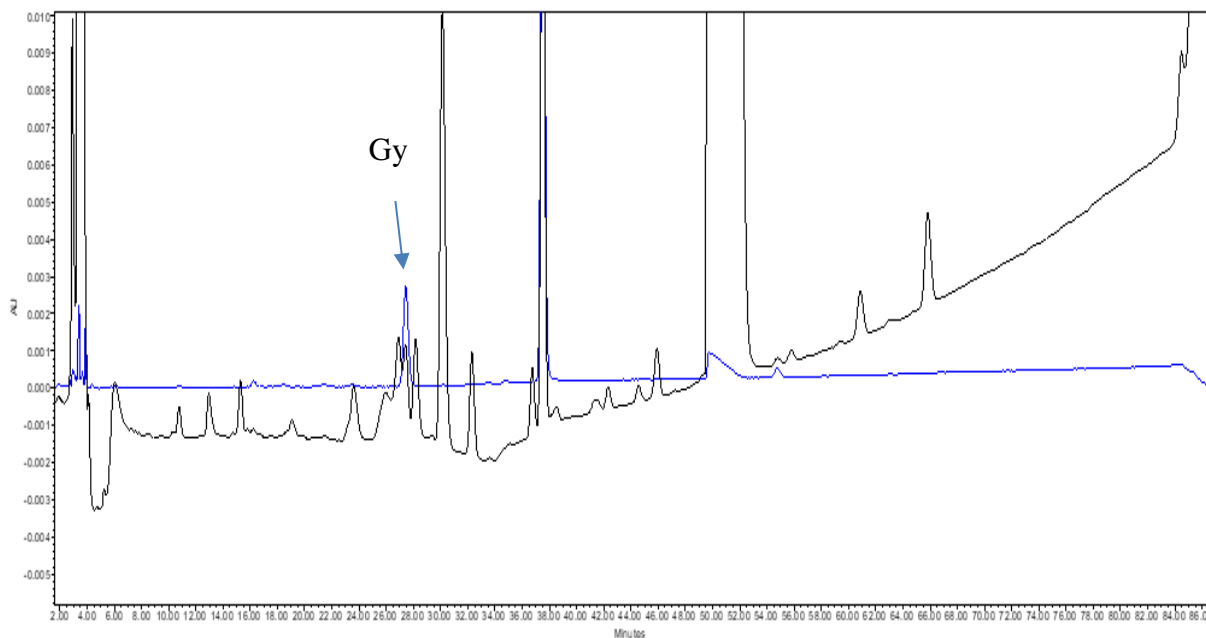


Slika 8. Kromatogram identifikacijske otopine gdje su sva onečišćenja razdvojena.



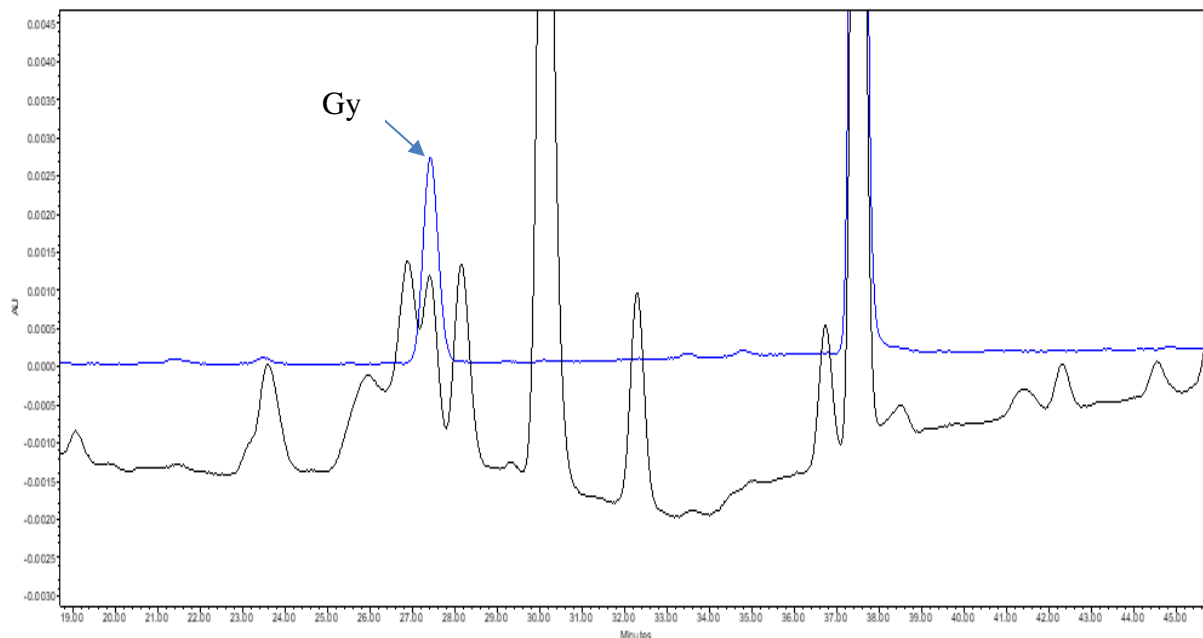
Slika 9. Usporedba kromatograma marker otopine na 210 nm (crno) i 265 nm (plavo).

Onečišćenja G (G, Gx, Gy) identificiraju se uz pomoć kromatograma zabilježenog na 265 nm. U ovome primjeru Gy onečišćenje nije dobro odvojeno (Slika 9.).

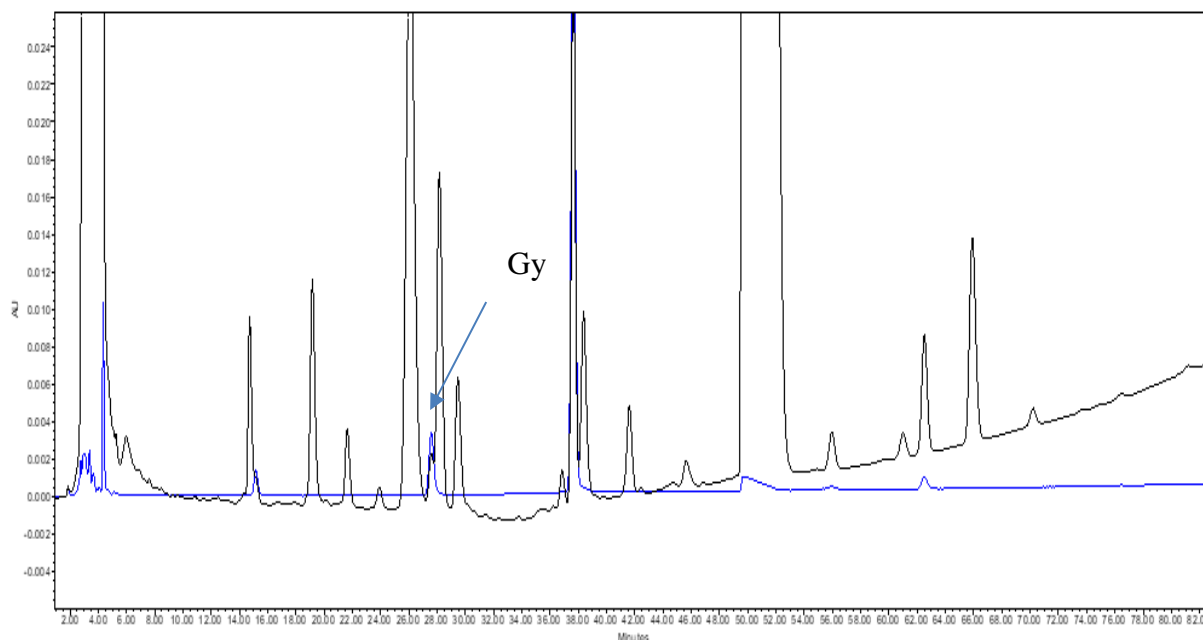


Slika 10. Usporedba kromatograma marker otopine na 210 nm (crno) i 265 nm (plavo). Onečišćenje Gy je odvojeno

Onečišćenja G (G, Gx, Gy) identificiraju se uz pomoć kromatograma na 265 nm. U ovome primjeru Gy onečišćenje je odvojeno (Slika 10.), a dobro je vidljivo odvajanje Gy onečišćenja od nepoznatog onečišćenja X na Slici 11.

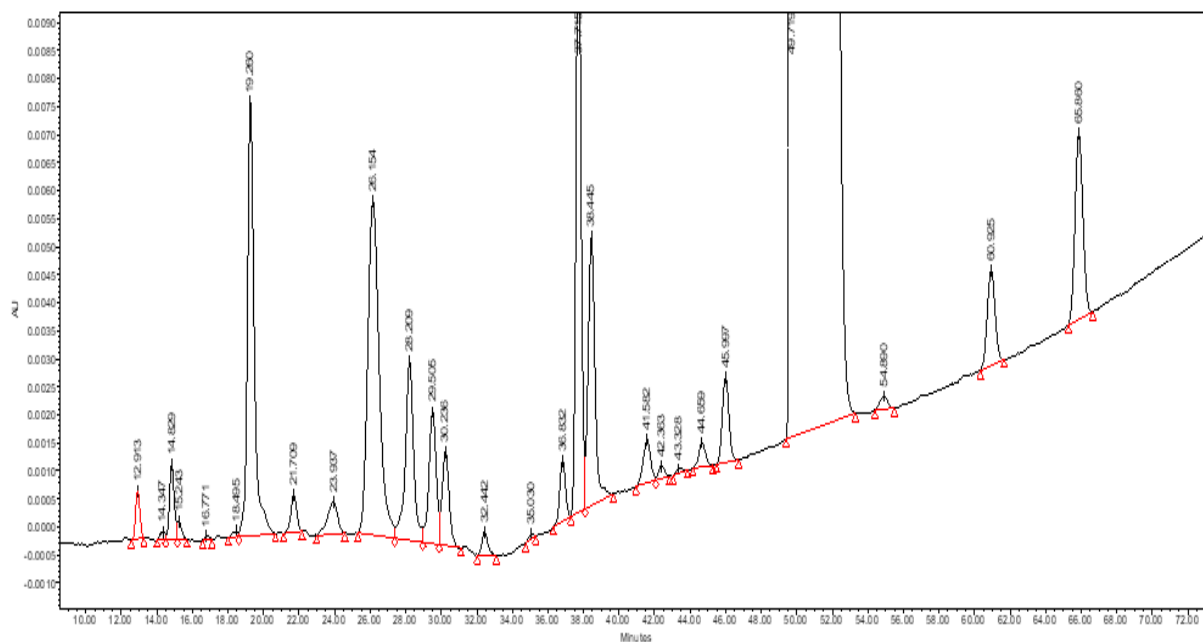


Slika 11. Kromatogram prikazan na Slici 10. u većem mjerilu.



Slika 12. Usporedba kromatograma otopine za identifikaciju pikova na 210 nm (crno) i 265 nm (plavo).

Onečišćenja G (G, Gx, Gy) identificiraju se uz pomoć kromatograma na 265 nm. U ovome primjeru Gy onečišćenje je odvojeno u kromatogramu otopine za identifikaciju koja sadrži ostala onečišćenja azitromicina (Slika 12.).



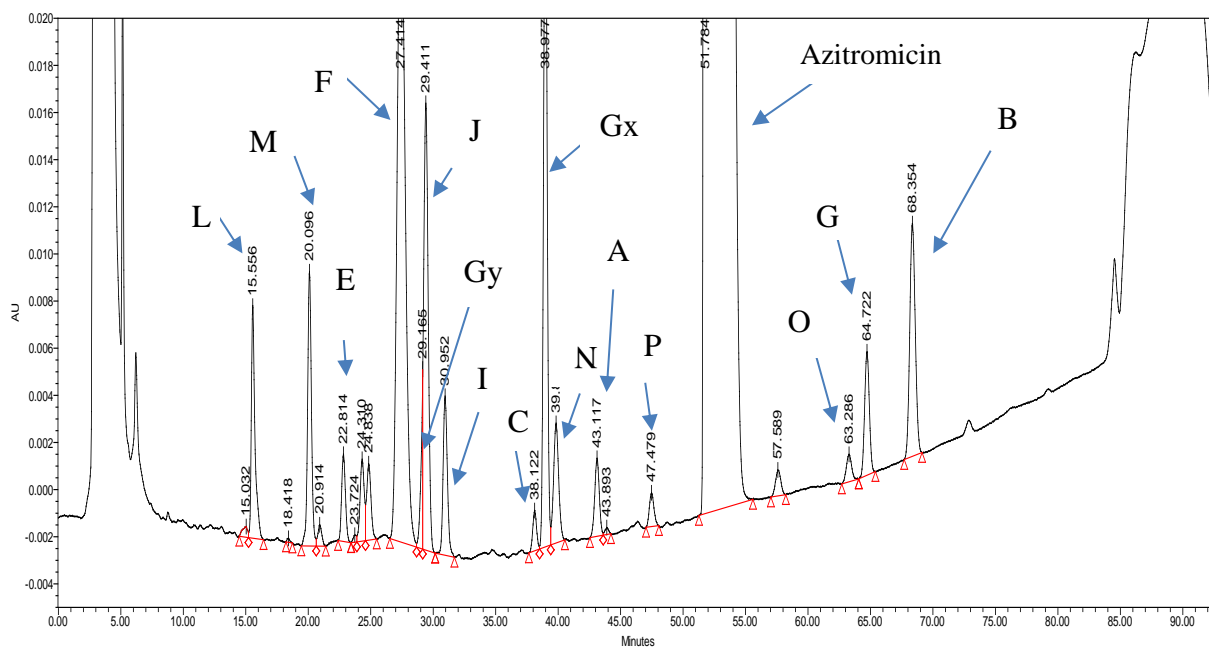
Slika 13. Kromatogram uzorka tableta azitromicin monohidrata.

Na Slici 13. prikazan je kromatogram uzorka tableta azitromicin monohidrata. Pikovi onečišćenja u tabletama se identificiraju usporedbom s otopinom za identifikaciju onečišćenja.

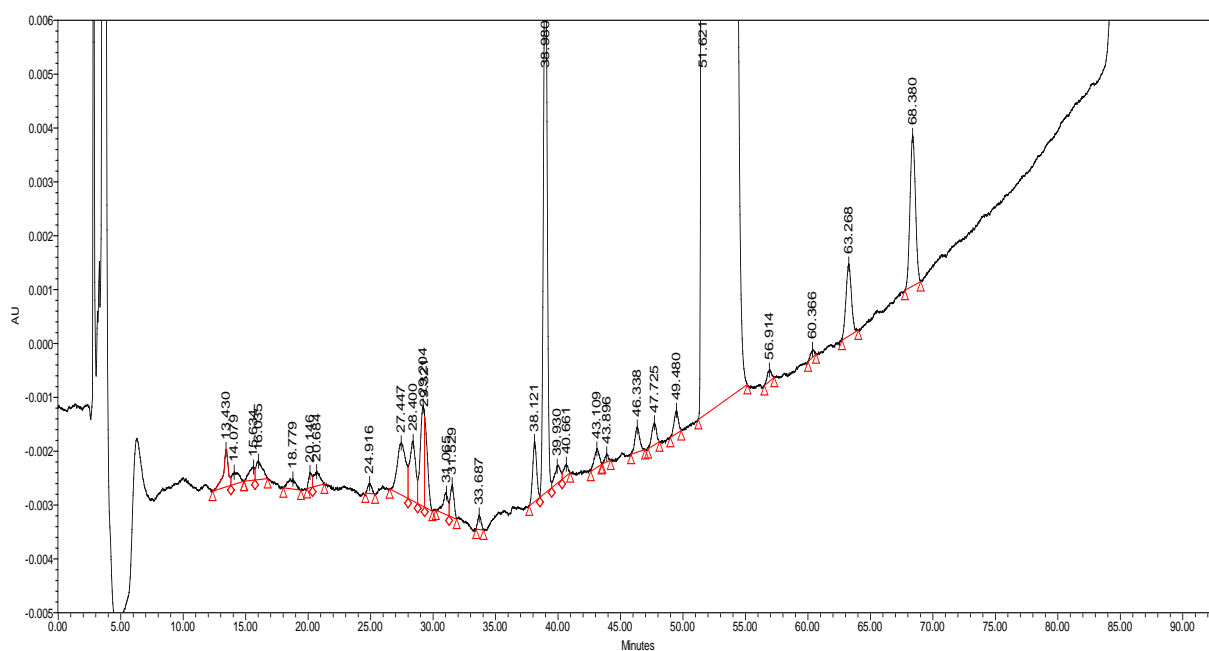
Metode za analizu onečišćenja u tabletama azitromicin monohidrata i azitromicin dihidrata su identične. Razlika je jedino u tome da li je nužno ili ne injektiranje marker otopine.

4.2 Analitika onečišćenja u kapsulama azitromicina

Na Slici 14. prikazan je kromatogram otopine za identifikaciju onečišćenja azitromicina dobiven prilikom analize kapsula azitromicina, a koja je identična otopini za identifikaciju onečišćenja u analizi onečišćenja tableta azitromicina.



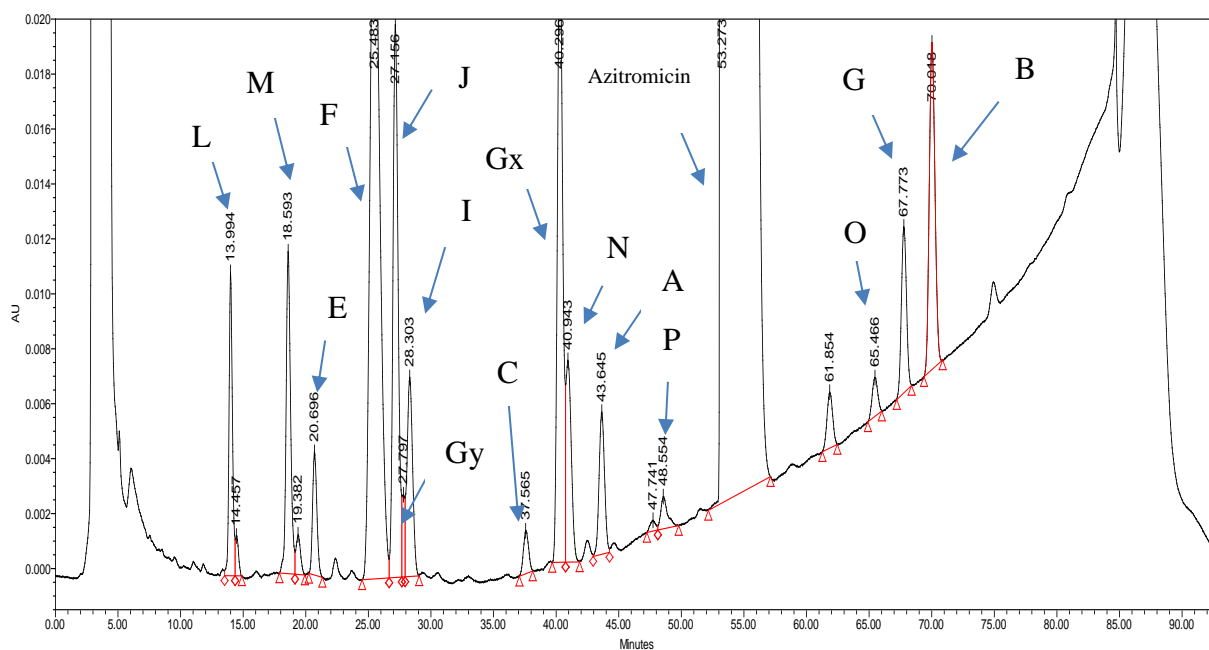
Slika 14. Kromatogram otopine za identifikaciju onečišćenja zabilježen tijekom analize onečišćenja kapsula azitromicina.



Slika 15. Kromatogram uzorka kapsula azitromicina.

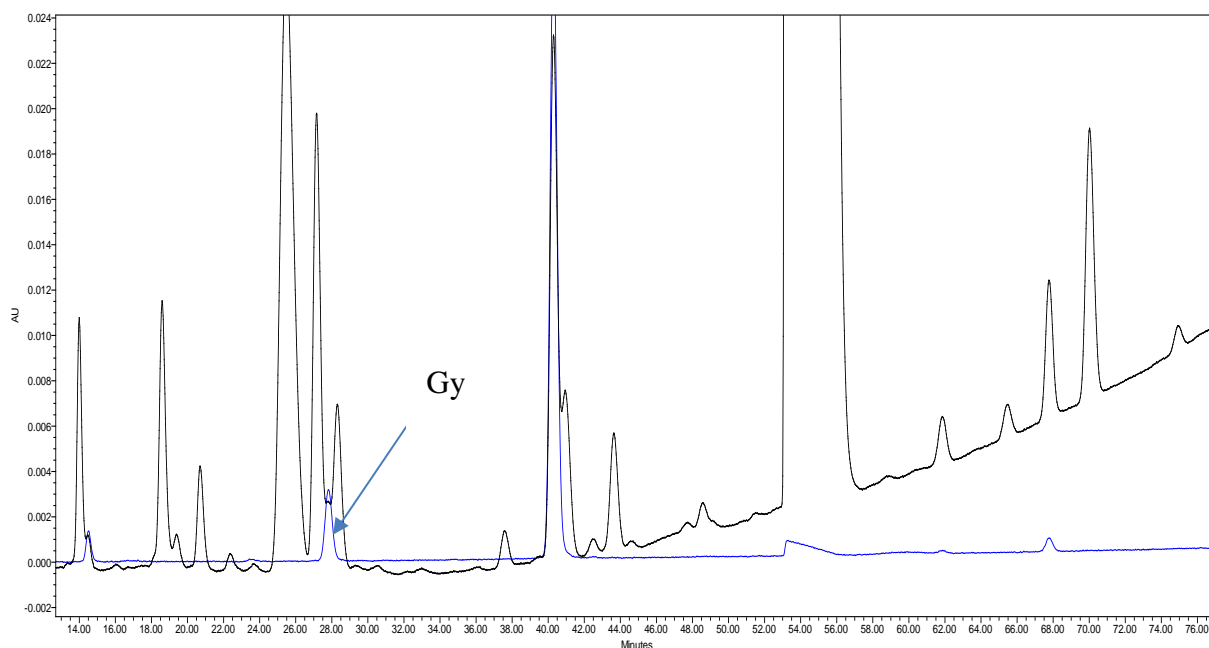
Kromatografski pikovi onečišćenja u uzorku kapsula (Slika 15.) identificiraju se usporedbom vremena zadržavanja onečišćenja dobivenih u kromatogramu otopine za identifikaciju onečišćenja (Slika 14.).

4.3 Analitika onečišćenja u injekcijama azitromicina



Slika 16. Kromatogram otopine za identifikaciju onečišćenja zabilježen tijekom analize onečišćenja injekcija azitromicina.

Metoda za analizu onečišćenja injekcija azitromicina ne zahtjeva odvajanje onečišćenja Gy (Slika 16.). Ukoliko se onečišćenje Gy ne odvoji ne može se provesti analiza onečišćenja tableta azitromicina.



Slika 17. Usporedba kromatograma otopine za identifikaciju pikova na 210 nm (crno) i 265 nm (plavo) u analizi onečišćenja azitromicin injekcija.

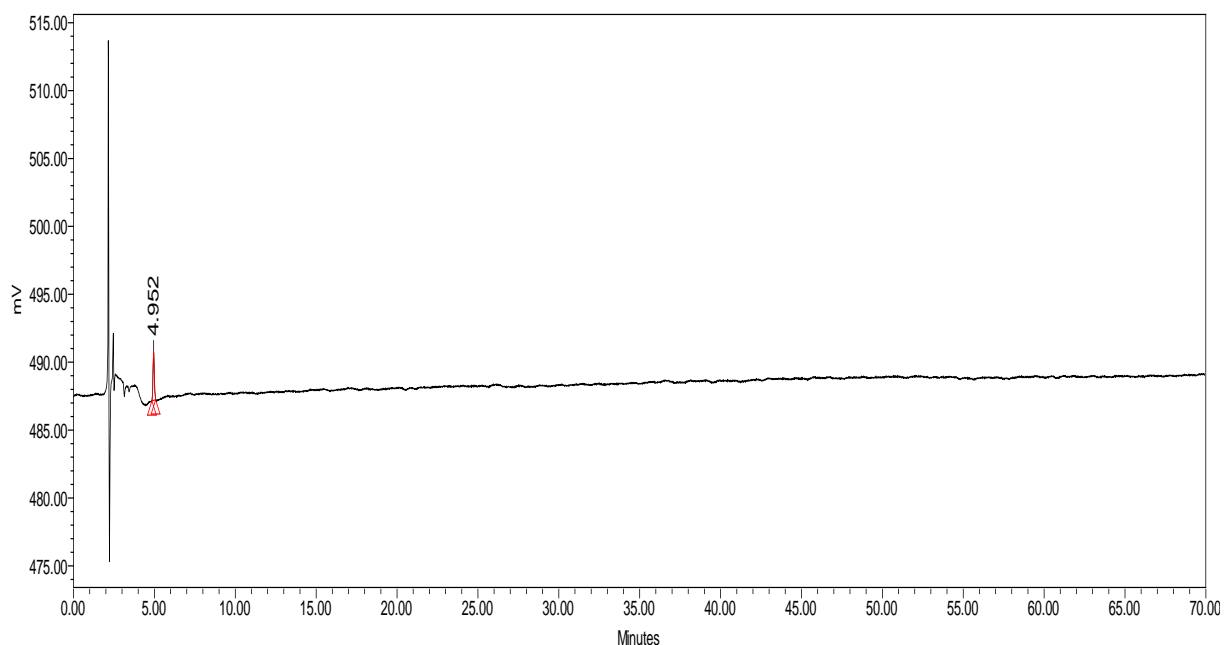
Na kromatogramu prikazanom na Slici 17. onečišćenje Gy nije dobro odvojeno, međutim metoda za analizu onečišćenja injekcija azitromicina ne zahtjeva odvajanje Gy onečišćenja.

Opisane kromatografske metode primijenjene su za određivanje onečišćenja u tabletama azitromicina (monohidrat i dihidrat), kapsulama i injekcijama azitromicina. Vidljivo je da su metode gotovo identične te da su dobiveni kromatogrami vrlo slični. To je značajno za svakodnevno izvođenje analiza u kontroli kvalitete azitromicinskih formuliranih proizvoda jer omogućava paralelno analiziranje uzoraka tableta, kapsula i injekcija. Potrebno je obratiti pažnju na marker otopinu, otopinu za identifikaciju onečišćenja i odvajanje onečišćenja Gy. Injektiranjem marker otopine provjerava se da li su se pikovi onečišćenja i pik nepoznatoga onečišćenja odvojili. Injektiranje otopine za identifikaciju onečišćenja potvrđuje odvajanje strukturno sličnih onečišćenja

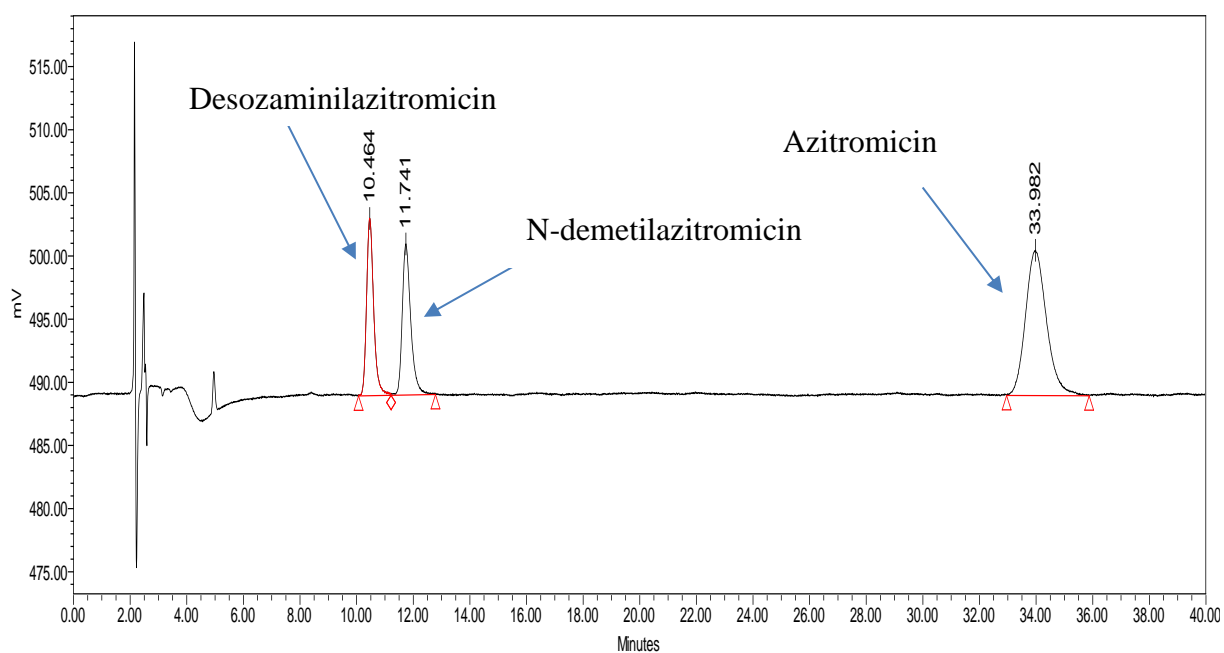
opisanom kromatografskom metodom te omogućava identifikaciju kromatografskih pikova onečišćenja usporedbom vremena zadržavanja. U praksi se nastoji onečišćenje Gy odvojiti od susjednih onečišćenja bez obzira što to nije uvijek nužno (na primjer u analizi onečišćenja u injekcijama azitromicina).

4.4 Analitika onečišćenja u sirupima azitromicina (monohidrat i dihidrat)

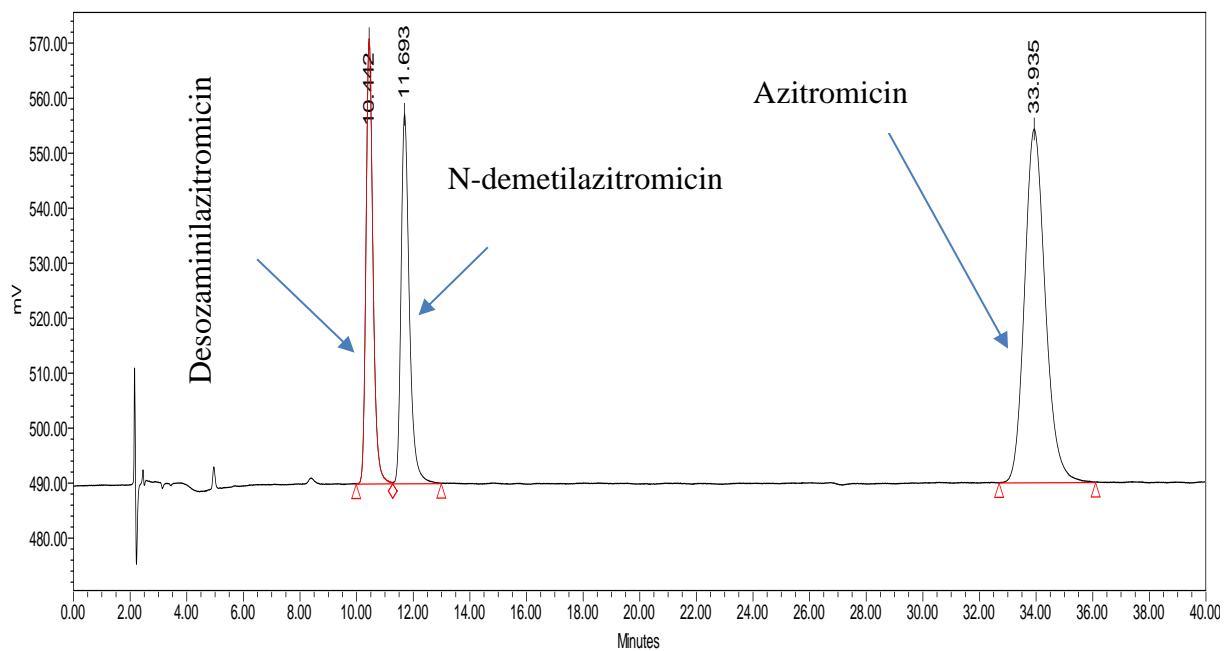
Analiza onečišćenja u sirupu azitromicin monohidrata i azitromicin dihidrata provodi se kromatografskom metodom u kojoj se detekcija vrši elektrokemijskim detektorom. Postavke detektora identične su u metodi za obje vrste uzoraka. Prikazani su kromatogrami slijepe probe (Slika 18.), LOQ otopine za određivanje limita kvantifikacije (Slika 19.), otopine standarda (Slika 20.) i kromatogram uzorka sirupa azitromicin monohidrata (Slika 21.) .



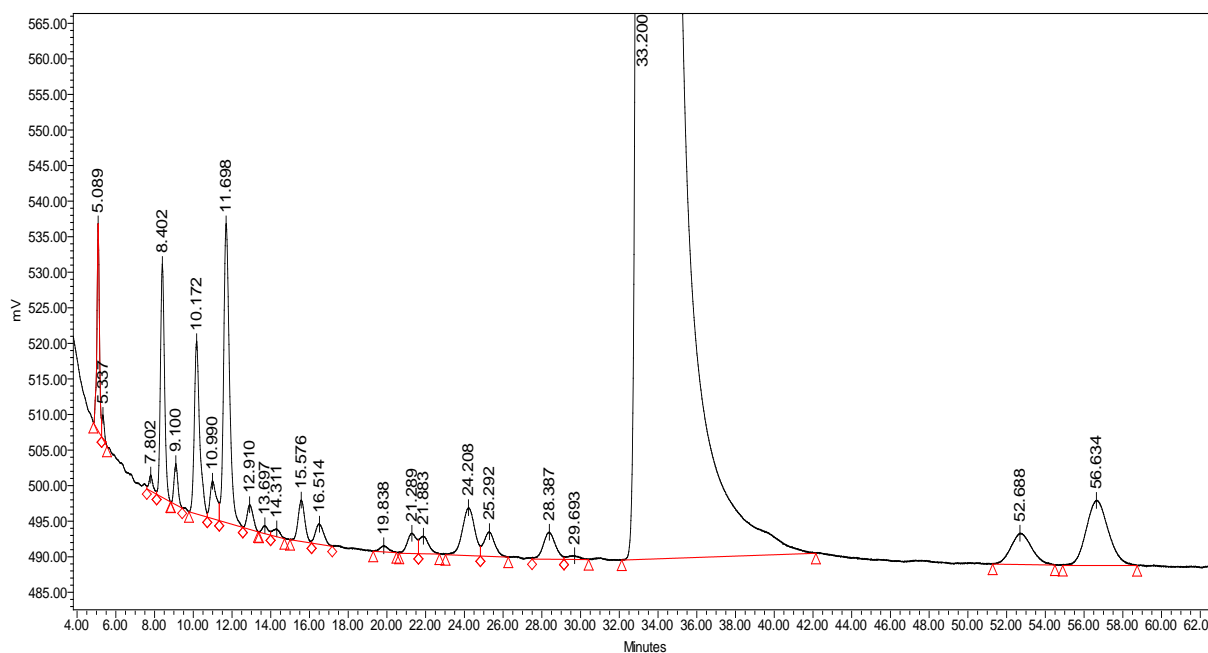
Slika 18. Kromatogram slijepe probe za analizu onečišćenja u sirupu azitromicin monohidrata.



Slika 19. Kromatogram LOQ otopine za analizu onečišćenja u sirupu azitromicin monohidrata.



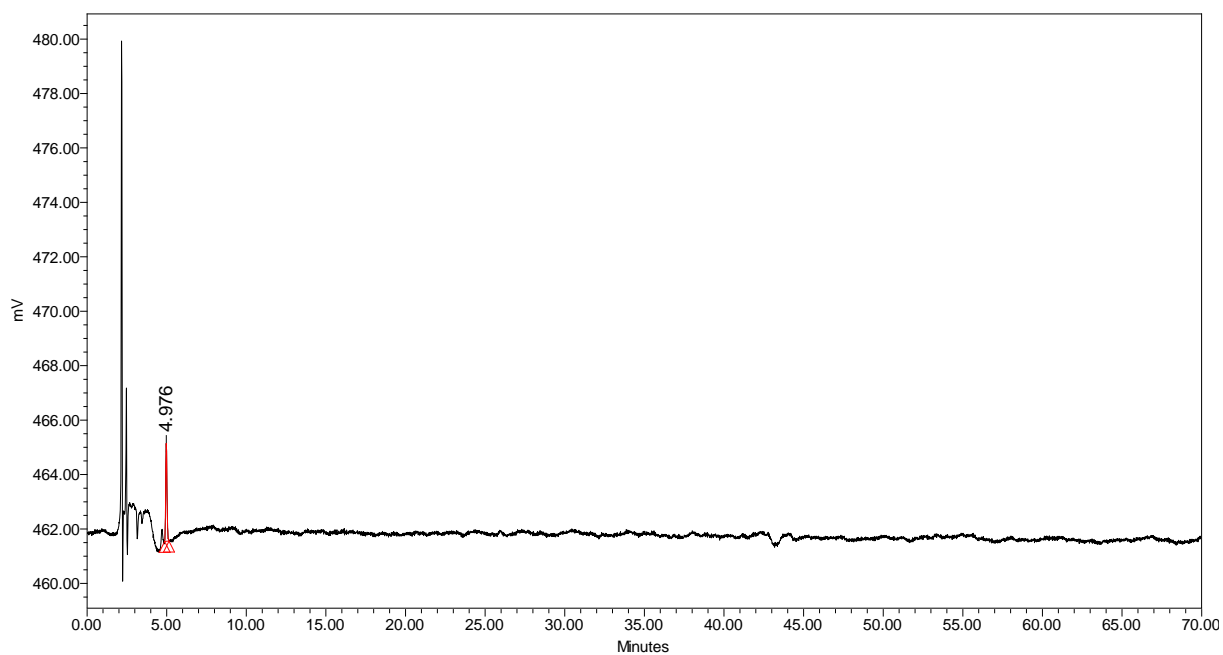
Slika 20. Kromatogram otopine standarda za analizu onečišćenja u sirupu azitromicin monohidrata.



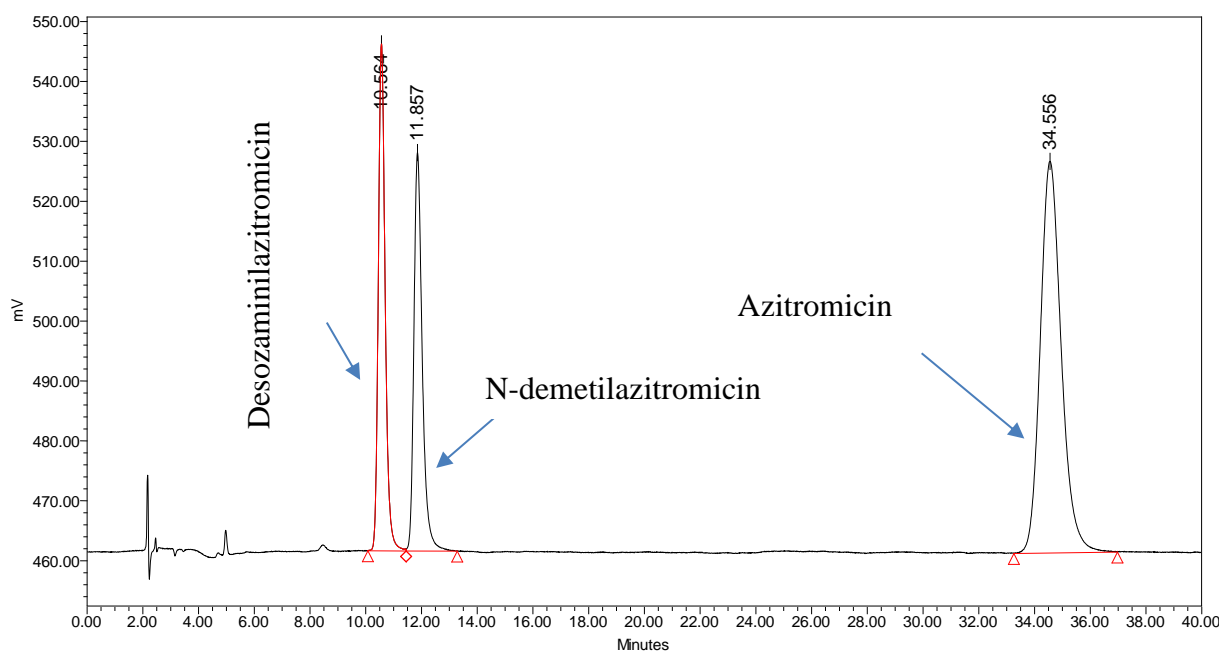
Slika 21. Kromatogram uzorka sirupa azitromicin monohidrat (doza 200mg).

Metoda za analizu sirupa ne propisuje analizu otopine za identifikaciju onečišćenja. Kromatografski pikovi onečišćenja identificiraju se prema relativnom retencijskom vremenu (RRT). Na kromatogramu otopine standarda za analizu onečišćenja u sirupu azitromicin monohidrata dobro su odijeljeni pikovi desozaminilazitromicina (onečišćenje J) s retencijskim vremenom 10.2 minute, N-demetilazitromicina (onečišćenje I) s retencijskim vremenom 11.7 minuta i azitromicina s retencijskim vremenom 33.2 minute (Slika 21).

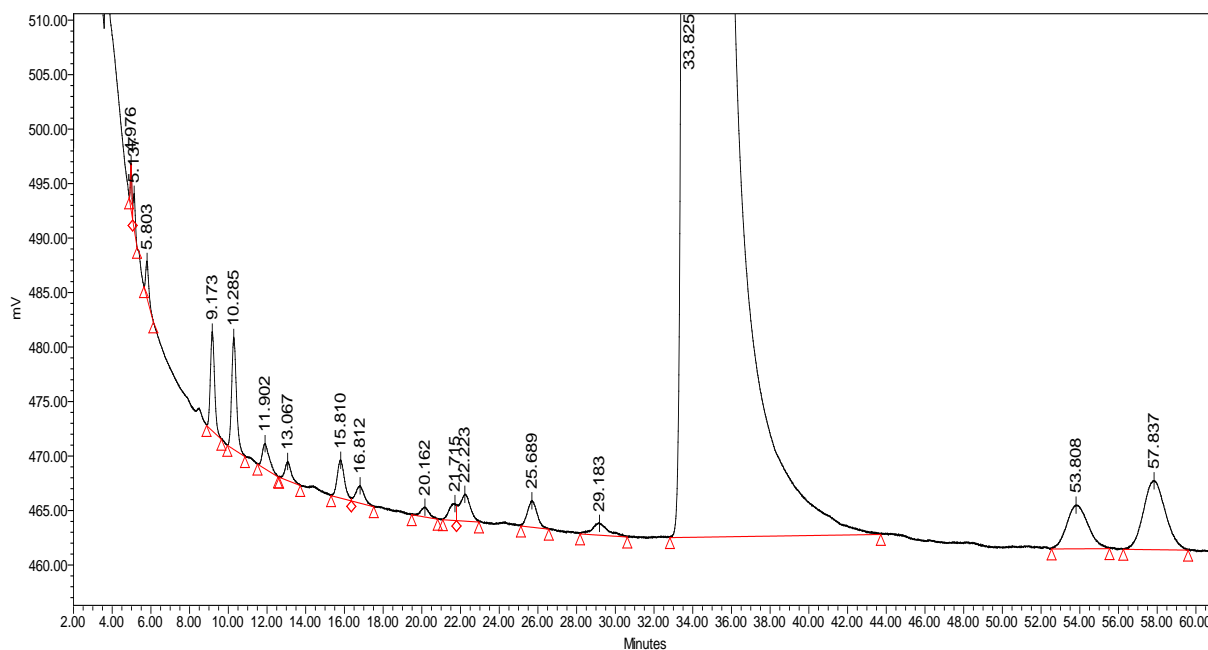
Prikazani su kromatogrami slijepe probe (Slika 22.), otopine standarda (Slika 23.) te kromatogrami uzorka sirupa azitromicin dihidrata (Slike 24. i 25.).



Slika 22. Kromatogram slijepe probe za analizu onečišćenja u sirupu azitromicin dihidrata.

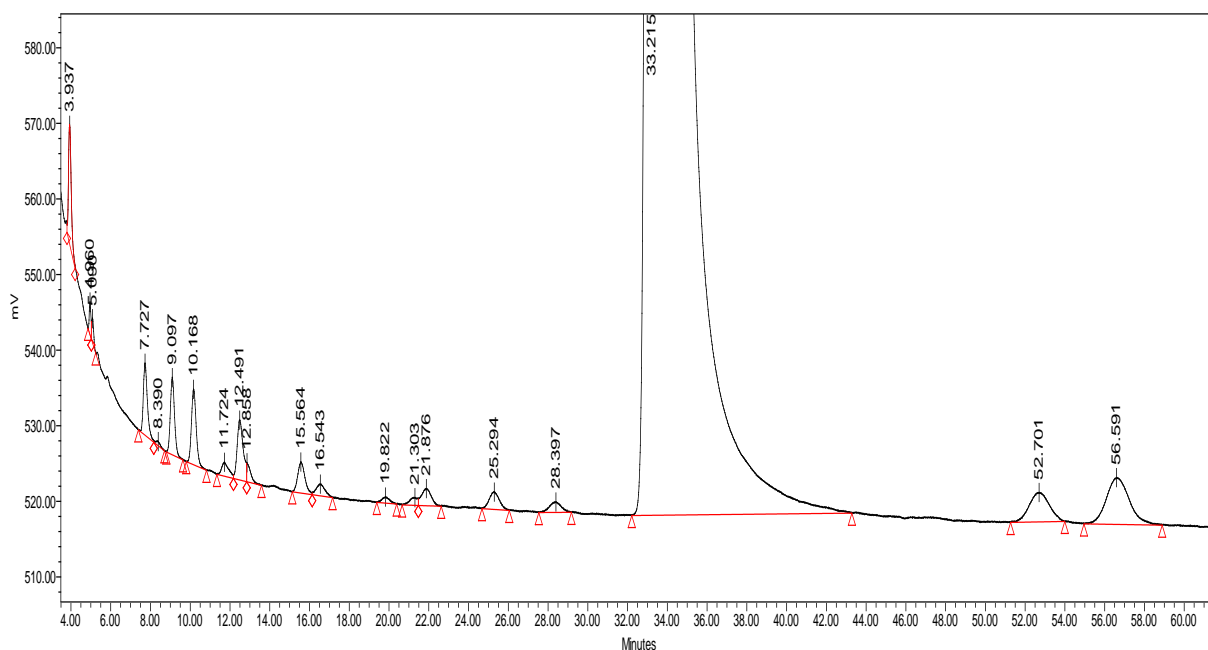


Slika 23. Kromatogram otopine standarda za analizu onečišćenja u sirupu azitromicin dihidrata.



Slika 24. Kromatogram uzorka sirupa azitromicin dihidrata (doza 100mg).

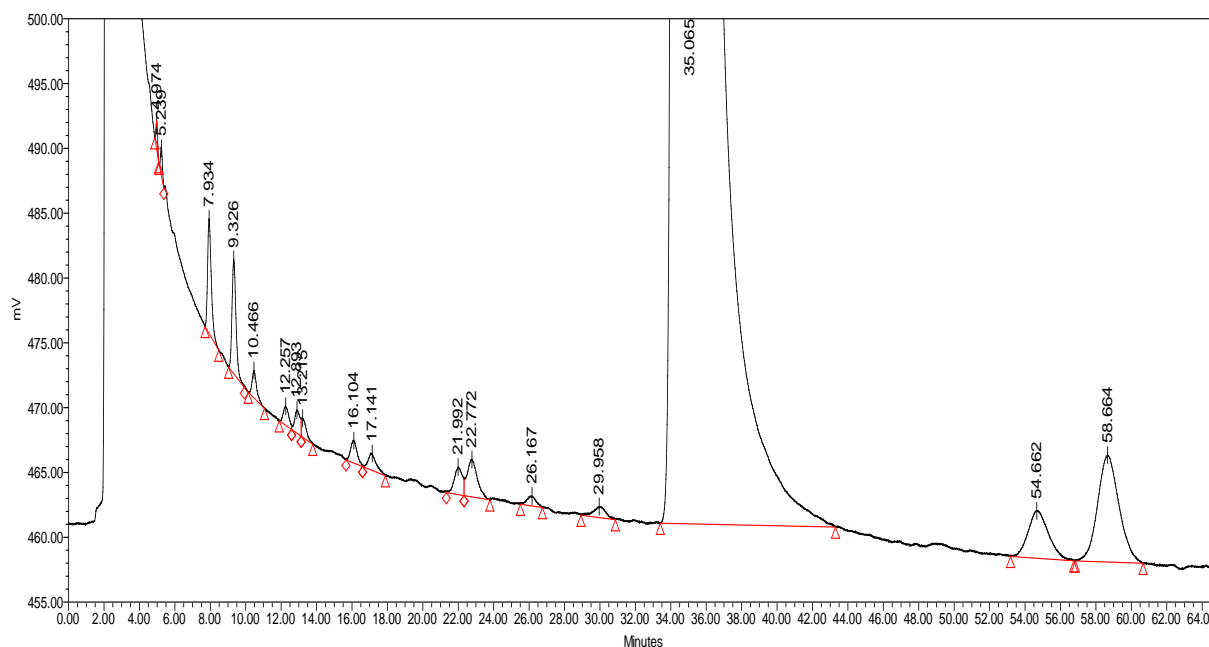
Nije potrebna priprema niti injektiranje LOQ otopina kao kod analiza monohidrat sirupa. Metoda za analizu onečišćenja u sirupu azitromicin dihidrata također ne propisuje analizu otopine za identifikaciju onečišćenja. Kromatografski pikovi onečišćenja identificiraju se prema relativnim retencijskim vremenima (RRT) navedenim u metodi.



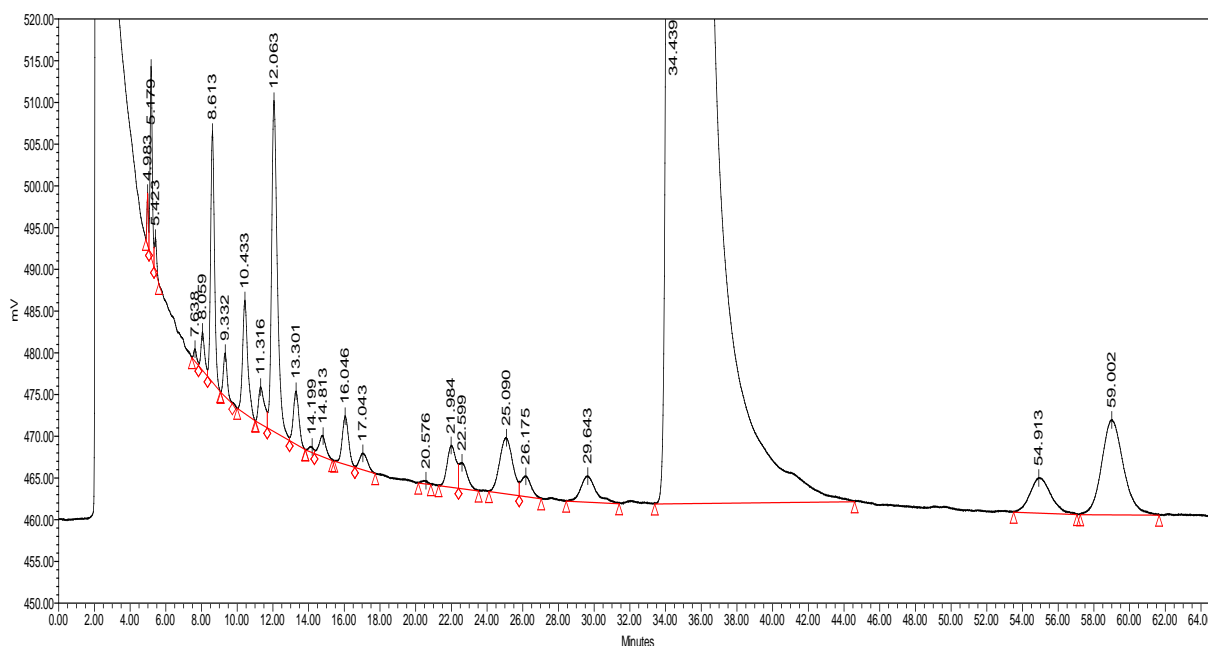
Slika 25. Kromatogram uzorka sirupa azitromicin dihidrata (doza 200mg).

Na kromatogramima uzoraka sirupa azitromicin dihidrata (Slika 24. i Slika 25.) dobivenim s EC detektorom uočljiva je malena razlika koja potječe od različitog placeba. Kromatografski pikovi se identificiraju prema relativnim retencijskim vremenima navedenima u metodi analize.

Zatim, prikazani su kromatogrami uzorka sirupa azitromicin dihidrata zabilježeni u stabilitetnim ispitivanjima na početnoj točki (Slika 26.) kao i na posljednjoj točki (nakon 24 mjeseca) stabilitetnog ispitivanja (Slika 27.).



Slika 26. Kromatogram uzorka sirupa azitromicin dihidrata na početnoj točki stabilitetnog ispitivanja.



Slika 27. Kromatogram istog uzorka sirupa azitromicin dihidrat na posljednjoj točki stabilitetnog ispitivanja (nakon 24 mjeseca).

Iako je prema slici samog kromatograma teško procijeniti vrijednost sadržaja onečišćenja, vidljivo je da površine kromatografskih pikova razgradnih onečišćenja vremenom rastu.

Kromatografski uvjeti i kromatogrami uzoraka sirupa azitromicin monohidrata i azitromicin dihidrata gotovo su identični. Prema tome, opisanom kromatografskom metodom moguće je istovremeno provesti analizu onečišćenja u sirupu azitromicin monohidrata i dihidrata. Potrebo je samo paziti na zadovoljavanje uvjeta pri ispitivanju prikladnosti sustava s obzirom da je za analizu sirupa s azitromicin monohidratom u metodi potrebno provjeriti omjer signala i šuma.

Usporedbom metoda za analizu onečišćenja azitromicinskih proizvoda možemo zaključiti da su opisane kromatografske metode za analizu onečišćenja u tabletama,

kapsulama i injekcijama vrlo slične, kao i metode za analizu onečišćenja u sirupima. Stoga se, onečišćenja u tabletama, kapsulama i injekcijama azitromicina mogu analizirati zajedno. Također, analize onečišćenja u sirupima se mogu raditi zajedno. Potrebno je obratiti pažnju na zahtjeve prikladnosti sustava.

Svakako, u svakodnevnom radu laboratorija kontrole kvalitete poželjno je da su metode za analizu različitih formulacija s istom djelatnom tvari slične. To ubrzava i pojednostavljuje rad te povećava efikasnost laboratorija.

4.5 Farmakopejske metode i pregled literature

Europska farmakopeja sadrži monografiju azitromicin aktivne supstancije, ali ne sadrži monografije pojedinih dozirnih oblika [24]. Za razliku od Europske farmakopeje, Američka farmakopeja [25] sadrži, osim monografije aktivne supstancije i monografije za kapsule, injekcije, sirupe i tablete. Metoda za analizu onečišćenja je propisana za injekcije i tablete.

Metoda za analizu onečišćenja u injekcijama azitromicina sastoji se od dva dijela, određivanja azitromicin N-oksida, desozaminilazitromicina i N-demetilazitromicina, i posebno, određivanja aminoazitromicina, formamido analoga, metilformamido analoga i 3-de(dimetilamino)-3-oksoazitromicina. Navedena dva dijela možemo tumačiti i kao dvije različite metode. Metode su HPLC s amperometrijskim elektrokemijskim detektorom s elektrodom od staklastog ugljika (*glassy carbon*). Radi se u oksidacijskom načinu s elektrodom 1 podešenom na +0,70 V, a elektrodom 2 na +0,82 V. Protok mobilne faze je 1 mL/min. Kolone su različite, prva metoda koristi 15 cm kolonu, dok druga koristi kolonu od 25 cm. Priprema uzorka je također različita,

koncentracija azitromicina u prvoj metodi je 0,3 mg/mL, a u drugoj 0,6 mg/mL. Različita je i mobilna faza, prva metoda koristiti mobilnu fazu u kojoj su acetonitril i fosfatni pufer u omjeru 23/77 i pH se podešava na 10,55, a u drugoj su acetonitril i fosfatni pufer u omjeru 46/54 i pH se podešava na 11. S obzirom da se određuju različita onečišćenja, različiti su i propisani standardi.

Za razliku od određivanja onečišćenja u injekcijama, Američka farmakopeja za analizu onečišćenja u tabletama propisuje samo jednu metodu. Elucija je u ovom slučaju gradijentna. Mobilna faza "A" se sastoji od vode i amonijevog hidroksida u omjeru 2000/1,2 i pH 10,5. Mobilna faza "B" se sastoji od acetonitrila, metanola i amonijevog hidroksida u omjeru 1800/200/1,2. Protok mobilne faze je 1,2 mL/min, a kolona je duljine 15 cm. Detekcija se vrši UV detektorom na 210 nm. Usporedbom farmakopejskih metoda i „*in house*“ metoda, jasno je da su farmakopejske složenije, naročito metoda za analizu onečišćenja u injekcijama.

Pregledom literature nije pronađeno mnogo radova koji se bave analitikom onečišćenja gotovih proizvoda azitromicina, većina se bavi analitikom aktivne supstancije [26,27,28]. Izdvojiti će se rad Miguel i Barbas-a [29] koji su razvili metodu za određivanje onečišćenja u tabletama azitromicina. Odvojeno je ukupno šest onečišćenja, a pet je moguće i kvantificirati s prihvatljivom točnošću i preciznošću. Autori su koristili fosfatni pufer (pH 7) kao mobilnu fazu "A" i smjesu metanola i acetonitrila kao mobilnu fazu "B". Elucija je gradijentna, a detekcija se vrši na 210 nm s UV detektorom.

5. Zaključak

Azitromicin je makrolidni antibiotik koji se koristi za liječenje bakterijskih infekcija. Antibiotik je širokog spektra djelovanja. Danas se nalazi na tržištu u obliku tableta, sirupa, kapsula i injekcija. Jedno od analitičkih ispitivanja koja se provode u kontroli kvalitete lijekova je analiza onečišćenja (srodnih spojeva i razgradnih produkata). Onečišćenja mogu nastati tijekom proizvodnje ili skladištenja farmaceutskog proizvoda i njihov sadržaj se mora kontrolirati. Onečišćenja azitromicina se analiziraju tehnikom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) u svim vrstama dozirnih oblika. Analitika onečišćenja azitromicin tableta, kapsula i injekcija je gotovo identična. To omogućava da se uzorci analiziraju istovremeno na istom kromatografskom sustavu. Postoje malene razlike u zahtjevu za prikladnost sustava, ali ukoliko se kompletna prikladnost sustava provjeri svi uzorci se mogu analizirati paralelno. Analitika onečišćenja sirupa je drugačija zbog različitoga načina detekcije. Stoga se sirupi analiziraju posebno, na HPLC instrumentu s EC detektorom.

Za redovan rad u laboratoriju kontrole kvalitete poželjno je da su metode slične i da se različite doze i formulacije s istom djelatnom tvari mogu zajedno analizirati. Tako se ubrzava rad, povećava efikasnost i smanjuje mogućnost pogreške.

6. Literatura

1. Haleem M, Y.S. Maissa, A.F. Faten, E.A. Laila, Quality in the pharmaceutical industry – A literature overview, *Saudi pharmaceutical journal* (2015) 23, 463-469.
2. MDS-3: Managing access to medicines and health technologies, Arlington, VA, Management sciences for health, 2012.
3. https://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/quality_assurance/control/en/ Pristupljeno 30.12.2018.
4. <https://alkaloid.com.mk/pharmaceutical-quality-control.nspx> Pristupljeno 30.12.2018.
5. Meyer V.R., Practical High performance liquid chromatography, 5th edition, John Wiley and Sons Ltd, 2010.
6. Hansen S., Bjergaard S.P., Rasmussen K., Introduction to pharmaceutical chemical analysis, , John Wiley and Sons Ltd, 2012.
7. Kazakevich Y., LoBrutto R., HPLC for pharmaceutical scientists, John Wiley and Sons Ltd, 2007.
8. Dong M.W., Modern HPLC for practicing scientists, John Wiley and Sons Inc, 2006.
9. BAS, Principles of EC detection and troubleshooting guide, Instruction manual, MF-9083, Bioanalytical systems, Inc, 1994.
10. BAS, LC-4C, MF-9081, Instruction manual-Electrochemical detector, Bioanalytical systems, Inc, 2000.

11. Özkan SA., LC with Electrochemical Detection. Recent Application to Pharmaceuticals and Biological Fluids, *Chromatographia Supplement* Vol. 66, 2007.
12. Agilent 1200 series Variable Wavelength detector G1314B/G1314C (SL), User manual, Agilent technologies, Inc, 2006.
13. Agilent 1200 Infinity Series Diode Array detectors, User manual, Agilent technologies, Inc 2010-2011, 2012, 2013.
14. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163725814000552>
Pristupljeno 31.12.2018.
15. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/050710s44-050711s41-050784s28lbl.pdf Pristupljeno 31.12.2018.
16. <http://www.croatia.org/crown/articles/10440/1/Azithromycin-or-Sumamed-one-of-worlds-best-selling-antibiotics-product-of-Croatian-company-PLIVA-Zagreb.html> Pristupljeno 31.12.2018.
17. Impurities in new drug substances Q3A(R2), ICH harmonised tripartite guideline, Current step 4, dated 25 October 2006.
18. Impurities: Guideline for residual solvents Q3C(R6), ICH harmonised guideline, Current step 4 version, dated October 20, 2016.
19. Guideline for elemental impurities Q3D, Current step 4 version, dated 16 December 2014.
20. Impurities in new drug products Q3B (R2), ICH harmonized tripartite guideline, Current step 4 version, dated 2 June 2006.
21. Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1), ICH harmonised tripartite guideline, Current step 4 version, dated 27 October 1994.

22. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> Pristupljeno 01.01.2019.
23. Bajaj S, Singla D, Sakhuja N, Stability testing of pharmaceutical products, *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 02 (03); 2012; 129-138.
24. European Pharmacopeia, 9.3, Council of Europe, Strasbourg, 2018.
Azithromycin, str. 4850-4852
25. United States Pharmacopeial Convention, USP-41-NF-36, official May 1 2018,
Azithromycin, str. 420-422.
26. Okaru AO, Abuga KO, Kamau FN, Ndwigah SN, Lachenmeier DW, A robust liquid chromatographic method for confirmation of drug stability of Azithromycin in bulk samples, tablets and suspensions, *Pharmaceutics*; 2017; 9,11.
27. Yang ZY, Wang L, Tang X, Determination of azithromycin by ion-pair HPLC with UV detection; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 49 (2009); 811-815.
28. Zeng A, Liu X, Zhang S i sur. Determination of azithromycin in raw materials and pharmaceutical formulations by HPLC coupled with an evaporative light scattering detector; *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* 9 (2014); 107-116.
29. Miguel L, Barbas C, LC determination of impurities in azithromycin tablets, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 33 (2003); 211-217

7. Životopis

OSOBNİ PODATCI	Marin Blagović Zagreb, Hrvatska
RADNO ISKUSTVO	11.2014-danas Pliva Hrvatska d.o.o Analitičar, kontrola kvalitete -Testiranje polaznih materijala, <i>in-process</i> uzoraka, stabilitetnih uzoraka i gotovih proizvoda. Kemijske analize, Karl Fisher titracije, oslobađanje djelatne tvari, HPLC, UV-VIS spektrofotometrija, IR spektroskopija -Precizno vođenje laboratorijskih zapisa -Provođenje i dokumentiranje laboratorijskih istraga -Pregled sirovih podataka -Rješavanje problema s instrumentima -Sudjelovanje u treninzima novih zaposlenika -Sudjelovanje u pregledu dokumentacije -Poznavanje Dobre proizvođačke prakse
OBRAZOVANJE	Magistar farmacije 2009-2014 Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilište u Zagrebu
MATERINSKI JEZIK	Hrvatski
STRANI JEZIK	Engleski
EDUKACIJE	-Edukacija HPLC i UPLC: Praktični pristup + „Donesi svoj problem“ radionica – Instrumentalia – Travanj 2016. -Edukacija HPLC i UPLC: Rješavanje i sprječavanje problema + „Donesi svoj problem“ radionica – Instrumentalia – Travanj 2016.